

**Voruntersuchungen zur mehrdimensionalen Proteomanalyse
mittels nativer chromatographischer Trennungen anhand des
Modell - Proteoms „humanes Serum“**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät der
Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Sina Schwedler

geboren am 31.08.1978 in Weimar

Gutachter

1. _____

2. _____

3. _____

Tag der öffentlichen Verteidigung:

**Gewidmet meinen Eltern, Gabriele und Peter Schwedler,
ohne deren verständnisvolle Unterstützung und Geduld,
ich nicht diesen Weg gegangen wäre.**

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua dest.	Aqua destillare
bovines IgG	bovines Immunglobulin G
BSA	bovines Serum Albumin
DEAE-Cellulose	Diethylaminoethyl-Cellulose
DEP	Diethanolaminphosphat
ESI-MS	Elektro-Spray-Ionization-Mass-Spektrometry
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatography
HiLoad-Superdex-Säule	HiLoad TM 16/60 – Superdex TM 200 prep grade Säule
HSA	humanes Serum Albumin
humanes IgG	humanes Immunglobulin G
ID No.	Identifikations-Nummer
MALDI-MS	Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Mass-Spectrometry
max.	Maximum
MG	Molekulargewicht
min.	Minimum
MP	Mikroplatte
MW	Molekulargewicht
NaCl	Natriumchlorid
No.	Nummer
OD	optische Dichte
PBS	Phosphat buffered saline
PCG	Polychromatograph
p-NP	para-Nitrophenol / p-Nitrophenol
Tab.	Tabelle
TRAP	Triethanolaminhydrochlorid
Tris	Tris (hydroxymethyl)-aminomethan
VK	Variationskoeffizient
λ	Wellenlänge

Einheiten:

Da	Dalton
dpi	Punkte pro Zoll (englisch: dots per Inch)
kDa	Kilodalton
M	Molar
min	Minute
mg/ml	Milligramm je Milliliter
mM	Millimolar
ng/μl	Nanogramm je Mikroliter
nm	Nanometer
rpm	Umdrehungen pro Minute (englisch: revolutions per minute)
μM	Mikromolar
μl/ml	Mikroliter je Milliliter
μl/well	Mikroliter je well

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Proteome - Definition, Bedeutung und Möglichkeiten der Proteomforschung	3
2.2 Stand der Proteomforschung	5
2.3 Die Entwicklung der Proteomforschung am Beispiel des humanen Serums	6
2.4 Die N-dimensionale chromatographische Trennung von Proteinen	6
2.5 Methoden der Protein Quantifikation	10
2.5.1 Die Methode nach Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250)	10
2.5.2 Die Biuret-Reaktion	11
2.5.3 Die Silberfärbung	11
2.5.4 Die Bestimmung der UV-Absorbanz	11
2.6 Die Paralleldialyse	12
2.7 Aufgabenstellung	14
3 Materialien und Methoden	15
3.1 Technische Ausrüstung	15
3.2 Proteinbestimmung	17
3.2.1 Materialien	17
3.2.2 Methoden der Proteinbestimmung	17
3.3 Dialyse	20
3.3.1 Aufbau der Dialysekammer	20
3.3.2 Kontrolle der Kreuzkontamination	20
3.3.3 Dialyse gegen Aqua dest.	21
3.3.4 Dialyse gegen Pufferlösung	22
3.4 Materialien und Methoden der 1. Dimension	23
3.4.1 Chromatographische Trennsäule	23
3.4.2 Eichung	23
3.4.3 Serum	24
3.4.4 Lösungen und Chemikalien	25
3.4.5 Durchführung	26
3.5 Materialien und Methoden der 2. Dimension	26
3.5.1 Chromatographische Matrix	26
3.5.2 Aufbau des Polychromatographen	26

3.5.3	Achterblock	28
3.5.4	Lösungen und Chemikalien	28
3.5.5	Vorbereitung des Polychromatographen	29
3.5.6	Prüfung des Polychromatographen	30
3.5.7	Ablauf des Trennvorganges	30
3.6	Eingesetzte Formeln	31
4	Ergebnisse	32
4.1	Proteinbestimmungsmethoden	32
4.1.1	Standardmethoden	32
4.1.2	Proteinbestimmung durch Silberfärbung	35
4.1.3	Proteinbestimmung durch optische Messung (OD)	39
4.2	Ergebnisse der Dialyse	44
4.2.1	Basale Eigenschaften	44
4.2.2	Dialyse von Protein-Lösungen	45
4.2.3	Wiederfindung von Proteinen in 1D-Serumfraktionen	46
4.3	Trennung in der 1. Dimension – Größenausschlußchromatographie	47
4.3.1	Eichung der Säule	47
4.3.2	Native Größenausschlusschromatographie von humanem Normal-Serum	48
4.4	Trennung in der 2. Dimension	49
4.4.1	Test des Polychromatographen (PCG)	49
4.4.2	Serumtrennung - 2. Dimension	53
5	Diskussion	57
5.1	Das Modell-Proteom „humanes Serum“	57
5.2	Beurteilung der Quantifizierungsmöglichkeiten	59
5.3	Weiterentwicklung der Dialysekammer	61
5.4	Einschätzung der chromatographischen Trenntechnik	63
5.5	Vergleich mit anderen publizierten Serum-Proteom-Untersuchungen	66
6	Schlußfolgerungen	69
7	Literaturverzeichnis	71

1. Zusammenfassung

Nach der Aufklärung des Genoms zahlreicher Organismen wächst die Zahl der Untersuchungen der Phänotypen in einer bislang nicht gekannten Breite. Aus der Kenntnis der hohen Komplexität jeder biologischen Einheit werden zunehmend ganzheitliche Untersuchungen angestrebt, die zwingend neuer Analysetechnologien bedürfen. Trotz zahlreicher initialer prinzipieller wie technologischer Lösungen erweisen sich sowohl Proteomics als auch die anderen neuen „Omics“-Ansätze (Peptidomics, Glycomics, Metabolomics, Lipidomics, Nutrigenomics usw.) immer noch als enorme Herausforderung an das methodisch-technologische Vorgehen. Sie sind extrem aufwendig, arbeits- und kontrollintensiv und gegenwärtig nur mit völlig unzureichenden Durchsätzen möglich (Omenn et al. 2006). Von diesen Technologien werden jedoch wesentliche Impulse bei der Biomarkersuche (z.B. im Rahmen des klinischen Proteomics) und in der Wirkstoffsuche und -Testung der forschenden pharmazeutischen Industrie inklusive Toxizitätstestung erwartet. Im Gegensatz zur Genomanalyse ist diesen Untersuchungsstrategien ein großes strukturelles Spektrum nicht amplifizierbarer Analyte als Objekt gemeinsam, das nur mit einer Vielzahl analytischer Methoden erfasst werden kann, dabei jedoch ähnliche Durchsätze erfordert wie bei der Genomanalyse. Zusätzlich zur eigentlichen Analytik sind neuartige Verfahren zur Probenvorbehandlung und zur Probenfraktionierung notwendig.

Im Institut für Biochemie I der FSU Jena wurde die Entwicklung einer nativen multidimensionalen chromatographischen Fraktionierungstechnologie für Proteomuntersuchungen unter Verwendung von Mikrotiterplatten und parallelisierter Dosiertechnik angestrebt, die u. a. in sich die Vorteile eines großen dynamischen Bereiches, die Erzeugung von flüssigen Subfraktionen, den Erhalt nativer Probenbestandteile und die Möglichkeit zu einer weitgehenden Automatisierung in sich vereint. Diese Technologie benutzt die Größenausschlusschromatographie für den ersten Trennschritt (1. Trenndimension, 1D) und parallelisierte Anionenaustauschchromatographie für den zweiten Trennschritt (2D). Weitere Trennprinzipien und -Schritte können sich anschließen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Voruntersuchungen im Rahmen dieser Entwicklungsarbeiten zu drei Schwerpunkten unter Verwendung von humanem Serum als zu untersuchendes Proteom vorgenommen:

1. Suche nach einer effizienten Proteinquantifizierungsmethode für Proteomfraktionen.
2. Die Prüfung eines simultanen Mediumwechsels einer Vielzahl von Fraktionen.
3. Erprobung von prototypischen Lösungen zur Parallelchromatographie.

Zu 1.: Von allen in Mikrotiterplatten bzw. im Mikrotiterplattenraster geprüften Verfahren zur Proteinquantifizierung erwies sich die UV-Absorbanzmessung als die vorteilhafteste Methode der Wahl. Mit ihr sind Proben und Fraktionen sehr effizient und verlustfrei in 96- und 384-well Mikroplatten messbar. Der dynamische Bereich erreicht durch Kombinationen verschiedener Messwellenlängen (205, 215 und 280 nm) nahezu vier Größenordnungen. Hinsichtlich Empfindlichkeit, Präzision, Praktikabilität, Kosten und Durchsatz ist diese Methode allen anderen untersuchten (Biuret, Bradford, BCA, Lowry, Silberfärbung) überlegen. Optimale Analyse-Volumina und Konzentrationsbereiche wurden definiert.

Zu 2.: Für den Mediumwechsel im Rahmen des Fraktionierungsverfahrens und auch für erforderliche Probenvorbehandlungen vor massenspektrometrischen Untersuchungen wurde eine neu entwickelte Dialyseplatte untersucht. Der Mediumwechsel erfolgt in Modelllösungen und 1D-Proteom-Fraktionen in Probenvolumina bis zu 280 µl mit 2h für alle Proben ausreichend schnell und reproduzierbar, es gibt keine Kreuzkontaminationen. Proteine > 50 kDa werden nach Dialyse ca. zu 100%, Peptide < 10 kDa im Mittel zu nahezu 40% wieder gefunden.

Zu 3.: Die Serum-Trennung mittels nativer Größenausschlusschromatographie erbringt reproduzierbar und mit guter Wiederfindung in wenigen Größengruppen co-chromatographierende bzw. in Proteinkomplexe vorliegende Proteine.

Der zur 2. Trennung entwickelte gravitationsgetriebene Polychromatographie-Block (PCG) mit DEAE-Cellulose als Trennmatrix wurde mit Farb-Modelllösungen als ausreichend reproduzierbar hinsichtlich Elutionscharakteristika und Elutionsvolumen getestet. Die konstruktionsbedingte Gefahr einer Kreuzkontamination verschiedener Säulchen hat sich nicht bestätigt. Der Block erwies sich sowohl für verschiedene Farben als auch für 1D-Fraktionen als effizientes Werkzeug zu parallelen Trennung einer großen Vielzahl von gleichartigen Proben.

Mit dieser Arbeit wurden wesentliche Verfahren und Werkzeuge bereitgestellt und geprüft, die im weiteren Verlauf zur erfolgreichen Trennung, Identifikation und Charakterisierung von Serumproteinen geführt hat. Mit Hilfe dieses Verfahrens konnten inzwischen 1860 verschiedene Serumproteine identifiziert (www.db-thueringen.de/servlets/DocumentServlet?id=4054) und im Vergleich von verschiedenen pathologischen Serumproben bis dahin bekannte Veränderungen evaluierend und bestätigend gefunden werden.

2. Einleitung

2.1 Proteome –

Definition, Bedeutung und Möglichkeiten der Proteomforschung

Der Begriff des Proteoms wurde 1994 mit der Definition „Proteome indicates the proteins expresses by a genome or tissue“ von Marc Wilkins (Huber 2003) eingeführt. Die Bezeichnung Proteom leitet er von der Formulierung „the protein product of the genome“ ab (Traini et al. 1998). Diese Aussage basiert auf der Erkenntnis, dass jede Zelle durch eine Anzahl vorhandener Proteine mit ihren Modifikationen gekennzeichnet ist. In einer jeden Zelle findet eine differenzierte Expression des statischen Genoms mit anschließender posttranslationaler Modifikation (Phosphorylierung und Dephosphorylierung, limitierte Proteolyse, Acetylierung, Methylierung, Adenylierung, Sulfatierung und Glykosylierung) statt (McDonald et al. 1994, Baenziger 1994, Mimnaugh et al. 1999). Beispielsweise haben eine Leberparenchymzelle, eine Nervenzelle des Gehirns und eine Mukosazelle des Darmes dieselbe genetische Information, aber völlig unterschiedliche Proteinausstattungen.

Wachstum, Differenzierung, Alterung, Umwelteinflüsse und genetische Manipulationen führen zu einem dynamischen Zustand des Proteoms (Traini et al. 1998). Die Quantifizierung und Identifizierung dieser Proteine können den Zustand der Zellen, des Gewebes und des Organismus wesentlich besser charakterisieren als das statische Genom. Dies begründet das Interesse an der Erforschung von Proteomen. Es existiert die Überlegung, dass die Varianz der Proteine nicht nur vom jeweiligen Gewebetyp (Zelltyp), sondern auch vom Bestehen einer Erkrankung abhängig ist. Eine Aussage über die veränderten Proteine des Proteoms könnte bei der Erkennung und Therapie von Krankheiten genutzt werden.

Innerhalb eines kurzen Zeitraumes ist bereits eine Vielzahl von Entwicklungen auf dem Gebiet der Proteomforschung in den Bereichen der Biochemie, Pharmakologie und Medizin zu beobachten. Die 2001 gegründete „Human Proteom Organisation (HUPO)“ setzt sich speziell mit dieser Thematik und der Kommunikation zwischen den einzelnen Forschungsgruppen auseinander (www.hupo.org). Das von der „HUPO“ initiierte „Plasma Proteom Projekt (PPP)“ unter der Leitung von Gil Omenn verfolgt 3 langfristige Ziele – die komplette Analyse der Proteinbestandteile des humanen Plasmas bzw. Serums, die Identifikation der biologischen Quellen (physiologische, pathologische oder pharmazeutische) für Plasmaveränderungen und die Ermittlung des Umfanges der Plasmamodifikation innerhalb einer Bevölkerungsgruppe und des einzelnen (Omenn 2004).

Zur Aufklärung der Zusammenhänge zwischen der genetischen Information und der Realisierung biologischer Funktionen bzw. dem Auftreten bestimmter Krankheitsstadien wird die Erforschung von Proteomen als nächster Schritt gesehen. So wurde zum Beispiel bereits das Proteom von Patienten mit bestehenden Tumorerkrankungen (kolorektaler und hepatocellulärer Tumor) auf tumor-assoziierte Proteine unter Anwendung einer 2-dimensionalen Elektrophorese durch Peter R. Jungblut und seine Mitarbeiter untersucht (Jungblut et al. 1999).

Ziel ist es, Proteine der Proteome aufzutrennen und die enthaltenen Proteine zu quantifizieren und identifizieren. Von Interesse sind außerdem die Interaktionen zwischen den Proteinen eines Proteoms und somit die gegenseitige Beeinflussung ihrer biologischen Funktionen (Pandey und Mann 2000). Die durch die Trennung, Quantifizierung und Identifizierung gewonnenen Daten sollen durch die Erstellung von Datenbanken überschaubar zusammengefügt werden. Das methodische Vorgehen und Ziel der Proteomforschung zeigt die Abb.1.

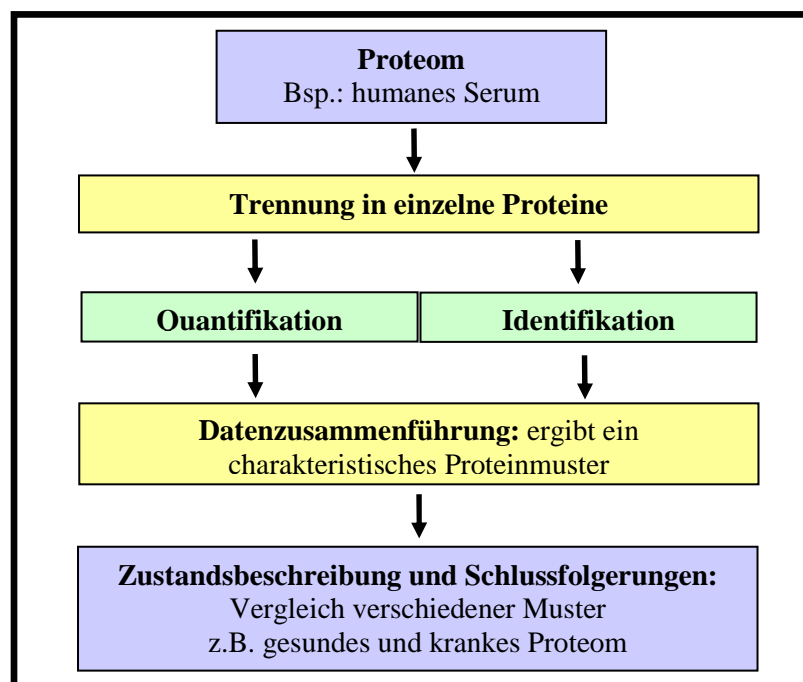


Abb.1: Ziel der Proteomforschung

2.2 Stand der Proteomforschung

Traditionell wird der Begriff „Proteomic“ mit der Trennung und Darstellung eines Proteingemisches über eine 2-dimensionale Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese in Verbindung gebracht. Wesentlich verbessert wurde die Identifikationsmöglichkeit von Proteinen durch die Fortschritte der letzten Jahre auf dem Gebiet der Massenspektrometrie, welche die Proteinanalyse erweiterten (Pandey und Mann 2000). Starke Impulse erhielt die Proteomforschung außerdem aus der Genomforschung. Die Überschneidung (z.B. Anwendung gleicher Trenn- und Identifikationsverfahren) und gegenseitige Beeinflussung (enger Zusammenhang zwischen Genom und Proteom, wechselseitige Nutzung neuer Ergebnisse) beider Gebiete fördert die Umsetzung der entsprechenden Ziele und lässt eine rasante Entwicklung in der Zukunft erwarten.

Bis zum gegenwärtigen Zeitpunkt erfolgt die Trennung der Proteingemische meist durch eine 2-dimensionale Elektrophorese, die Quantifizierung durch geeignete Proteinbestimmungsmethoden [meist in Form einer Silberfärbung, einer computergestützten Bildanalyse der Gele oder der Übertragung auf geeignete Membranen mit anschließender Analyse (Klose und Kobalz 1995)] und die Identifizierung mittels der Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization-Mass-Spectrometry (MALDI-MS) oder der Elektro-Spray-Ionization-Mass-Spektrometry (ESI-MS).

Bereits Ende der 80-er Jahre konnte eine Miniaturisierung der großen 1-D Gele in so genannte Mini-1-D Gele umgesetzt werden. B. J. Walsh und seine Mitarbeiter konnten dies auf 2-dimensionale Gele übertragen und kamen somit der Miniaturisierung und Parallelisierung in der Probenbearbeitung ein Stück näher (Walsh et al. 1998).

Mittlerweile beschäftigen sich aufgrund der großen Anzahl anfallender Proben bei der Untersuchung von Proteomen eine Reihe von Firmen mit der Entwicklung automatischer Systeme (Pandey und Mann 2000). Um eine Automatisierung zu erreichen, äußerte bereits 1998 John R. Yates den Gedanken, ein chromatographisches Verfahren bzw. eine Kapillarelektrophorese mit einer massenspektrometrischen Methode zu kombinieren (Yates 1998). Über eine geringere Flussgeschwindigkeit ($< 100 \mu\text{l/min}$) und ein minimales Elutionsvolumen soll eine hohe Konzentration an Peptiden zur Massenbestimmung mittels ESI-MS erreicht werden und damit die Analysemöglichkeiten erhöhen.

2.3 Die Entwicklung der Proteom-Forschung am Beispiel des humanen Serums

Die Erforschung der Proteine des humanen Serums lässt sich in verschiedene Phasen unterteilen, wobei sich die einzelnen Perioden zeitlich überlappen (Anderson und Anderson 2002).

Zunächst wurden die im menschlichen Blut enthaltenen Proteine hauptsächlich über eine einfache Fraktionierung unter Anwendung chemischer Methoden untersucht. Dabei konnten u.a. das „Albumin“ durch Liebig und Mulder zu Beginn des 19. Jahrhunderts und die „Globuline“ durch Schmidt (1862) analysiert werden (Putnam 1975-1987).

Der Einsatz verschiedener biochemischer Methoden (wie z.B. die Bestimmung der Enzymaktivität und Immunassays) dient der Quantifizierung, der in den Proben enthaltenen Proteine. Die Messung der enzymatischen Umsetzung bietet den Vorteil, dass eine Funktion der Proteine als Kriterium genutzt wird. Nachteilig ist, dass nicht immer eine bestimmte Aktivität gezielt einem Protein und somit keiner spezifischen Quelle zugeordnet werden kann. 1975 erfolgte die Entwicklung der 2-dimensionalen Elektrophorese zeitgleich durch Klose (Klose 1975) und O'Farrell (O'Farrell 1975). Hinzu kam ab 1990 die Möglichkeit der Identifikation von Proteinen und Peptiden durch deren Massenbestimmung mittels MALDI-MS oder ESI-MS. Mit Hilfe dieser Techniken konnte eine gezielte Identifizierung noch unbekannter humaner Serumproteine erfolgen. Bereits 2002 bzw. 2003 haben die Gruppen von N. L. Anderson 289 (Anderson und Anderson 2002) und R. S. Tirumalai (Tirumalai et al. 2003) über 340 Proteine identifizieren können. Wesentliche Ergebnisse sind darüber hinaus die Erprobung neuer Technologien sowie die Erstellung entsprechender Datenbanken der identifizierten Proteine (Mann 2002).

2.4 Die N-dimensionale chromatographische Trennung von Proteinen

Die etablierte 2-dimensionale Auftrennung von Proteinen mit Hilfe elektrophoretischer Trenntechnik weist eine Vielzahl von Nachteilen auf. Zu den allgemeinen limitierenden Faktoren der Elektrophorese gehören (Staudenmann et al. 1998):

- der eingeschränkte dynamische Bereich (10^2 - 10^4) in welchem Proteine charakterisiert werden können,
- die Ausschlussgrenze für Proteine mit einem Molekulargewicht > 150 kDa,
- die fehlende Trennung von Peptiden mit einem Molekulargewicht < 5 kDa,

- die Denaturierung vor und während der Trennung,
- die mangelhafte Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zwischen verschiedenen Arbeitsgruppen,
- die aufwändige und schwierige Handhabung bzw. Durchführung,
- die Problematik einer Automatisierung des Verfahrens.

Nach der Durchführung einer 2-dimensionalen Trennung dieser Art liegen die Proteine separiert nach ihrem isoelektrischen Punkt (1. Dimension) und ihrer Größe (2. Dimension) denaturiert im Gel vor. Aus diesem Grund ist die Quantifizierung der Proteine durch immunologische Verfahren oder die Aktivitätsbestimmung nicht mehr möglich. Die Identifikation der Proteine ist nach einem sich anschließenden enzymatischen Verdau („Peptid mass fingerprint“), einer Edman-Peptidsequenzierung oder eine Sequenzierung von „Sequence-tags“ im MS-MS möglich. Die erhaltenen massenspektrometrischen Daten werden durch einen Datenbank-Vergleich für die Proteinidentifizierung eingesetzt.

In unserer Arbeitsgruppe des Institutes für Biochemie I an der Friedrich Schiller Universität Jena wurde an einem Verfahren gearbeitet, welches eine Vielzahl der Nachteile der Elektrophorese umgeht (Horn et al. 2006). Dieses Verfahren beruht auf einer mehrdimensionalen, nativen, chromatographischen Trenntechnik für Proteine. Die Vorteile sind in folgenden Punkten zu sehen:

- der große dynamische Bereich der getrennten Proteinmenge,
- die Proteine liegen in Lösung vor,
- der Erhalt nativer Eigenschaften,
- ein breites Spektrum von Analysemethoden (z.B. Aktivitätsbestimmung und immunologische Verfahren)
- die bessere Reproduzierbarkeit der Trennungen,
- weitere Auftrennungen der Proben können erfolgen,
- gute Automatisierbarkeit.

Die Proteine eines Proteoms können unter Einsatz verschiedener chromatographischer Medien getrennt werden. Der Nachteil der potentiell geringeren Trennschärfe chromatographischer Verfahren kann durch eine höhere Anzahl von Trenndimensionen ($n > 2$) ausgeglichen werden. In der 1. Dimension kann z.B. eine Trennung nach dem

Molekulargewicht der Proteine genutzt werden. Die Fraktionierung erfolgt bereits hier im Mikrotiterplattenformat ($8 \times 12 = 96$ Fraktionen). Es ist nun möglich die Proben dem Format entsprechend auf 96 parallele Minisäulen aufzubringen und simultan zu trennen. Die gewonnenen $n \times 96$ Fraktionen liegen je nach Eigenschaft des Trennmaterials der Minisäulen separiert vor. Erfolgt die Trennung in der 2. Dimension z.B. über einen Anionenaustauscher (z.B. DEAE-Cellulose), so ist in der 3. Dimension eine Trennung nach hydrophoben Eigenschaften (z.B. Octyl-Sepharose) möglich.

Ein nicht unwesentlicher Faktor ist die Zeitdauer, welche für eine vollständige Trennung der angestrebten Dimensionen benötigt wird. Die klassische Gelchromatographie beansprucht eine Zeitdauer von ca. 100 min. Würde man die dabei gesammelten 96 Einzelfractionen in einem seriellen Verfahren ebenfalls über eine einzelne Säule mit einer Laufdauer von 100 min trennen, müsste dafür eine Zeit von 9.600 min bzw. 160 h eingeplant werden. Durch den gleichzeitigen Einsatz von 96 Minisäulen können die Fraktionen der 1. Dimension parallel getrennt und die dafür benötigte Zeit deutlich verringert werden. Die effektive Bearbeitung der großen Anzahl zu erwartender Proben ist durch die parallele polychromatographische Trenntechnik und die Nutzung vorhandener „liquid handling Technik“ möglich. Dieser Schritt in Richtung Automatisierung der Proteom -Charakterisierung bildet die Voraussetzung für einen großen Anwendungsbereich des Verfahrens. Eine Übersicht mit dem Flusschema der n-dimensionalen Trennung eines Proteingemisches zeigt die Abb.2 (Kreusch et al. 2003).

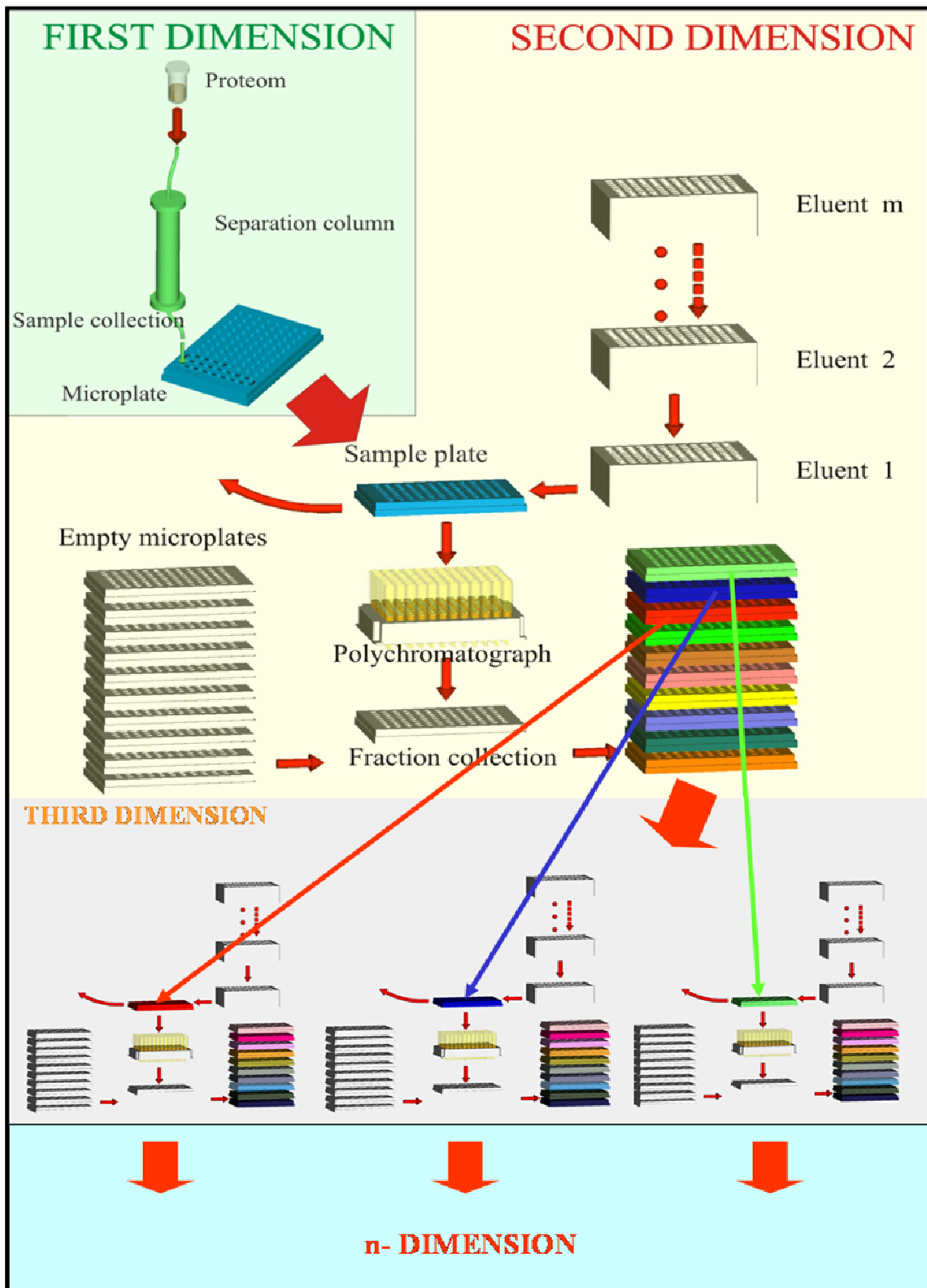


Abb.2: Flussschema der N-dimensionalen Trennung eines Proteingemisches (Kreusch et al. 2003)

2.5 Methoden der Protein-Quantifikation

Aufgrund der oftmals geringen Proteinkonzentrationen stellt die Protein-Quantifikation den am stärksten limitierenden Faktor in der Proteomforschung dar. In den vergangenen 20 Jahren wurden auf dem Gebiet der Quantifikation von Proteinen durch colorimetrische Verfahren eine Vielzahl an Methoden angewendet und verbessert (Sapan et al. 1999). Als Vergleichskriterien der unterschiedlichen Proteinbestimmungsmethoden eignen sich die Empfindlichkeit, der lineare Bereich, die Praktikabilität, das eingesetzte Probenvolumen, die Störfaktoren, der Zeitbedarf und die Kosten (Kreusch et al. 2003).

Zu den heutigen Standardmethoden in der Proteinquantifizierung im Mikrotiterplattenformat gehören u.a. die Methode nach Bradford, die Biuret Reaktion, die BCA/KBCA (Bicinchronic acid) Reaktion und die Methode nach Lowry. Im Folgenden werden einige mögliche Methoden näher erläutert, die auch im Rahmen der Arbeit getestet wurden.

2.5.1 Die Methode nach Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250)

Die Methode wurde 1963 von Fazekas de St. Groth et al. entwickelt und später durch Bradford popularisiert (Sapan et al. 1999). Die Reaktion beruht auf der Adsorption des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 im sauren pH-Wert Bereich an Aminosäuren und der typischen Lichtabsorbanz dieses Komplexes bei einer Wellenlänge von 595 nm. Die Änderung der Absorbanzhöhe ist in einem definierten Bereich proportional der Proteinkonzentration (Bradford 1976).

Sedmak und Grossberg ermittelten, dass Peptide mit einem Molekulargewicht < 3000 Da (z.B. bestimmte Hormone und bioaktive Peptide) sowie freie Aminosäuren keine Komplexbildung mit dem Farbstoff eingehen und mit dieser Methode daher nicht erfasst werden können (Sedmak und Grossberg 1977). Ein großer Nachteil der Bradford-Methode zeigt sich bei unterschiedlicher Proteinzusammensetzung in den Proben. Nicht alle Proteine besitzen das gleiche Verhältnis der zur Reaktion notwendigen Aminogruppen (Sedmak und Grossberg 1977). Außerdem wird die Bindung zwischen Protein und Farbstoff u.a. durch kationische Seitengruppen, protonierte Aminogruppen, und hydrophobe Eigenschaften beeinflusst (Sapan et al. 1999). Trotzdem kann diese Methode für Proteinmengen unterhalb eines $1\mu\text{g}$ in Form einer Mikroanalyse eingesetzt werden (Sedmak und Grossberg 1977).

2.5.2 Die Biuret-Reaktion

Das 1949 von Gornall et al. entwickelte Verfahren ist durch eine Reaktion von Kupfer-Ionen und der zu quantifizierenden Proteine gekennzeichnet (Sapan et al. 1999). Die ablaufende Chelatbildung ist an einen starken alkalischen pH-Wert gebunden und der entstehende Farbkomplex weist eine violette Färbung auf. Es besteht ebenfalls eine Proportionalität zwischen Absorbanz (550 nm) und Proteinkonzentration. Die Biuret-Reaktion ist jedoch unabhängig von der Zusammensetzung des Proteins, da die Komplexbildung an der Peptidbindung stattfindet (Sapan et al. 1999). Eingesetzt werden kann diese Methode für einen Bereich von 1-10 mg Protein je ml (Dunn 1997). Beeinflusst wird die Reaktion durch Ammonium-Ionen, Saccharose, Tris-Puffer, primäre Amine und Glycerol (Sapan et al. 1999).

2.5.3 Die Silberfärbung

Die Silberfärbung stellt ein etabliertes Verfahren zur Quantifikation von Proteinmengen nach elektrophoretischer Trennung dar. Die Proteine können entweder direkt (fixiert im Elektrophorese-Gel) oder indirekt (Übertragung auf eine Membran) gefärbt werden. Die Proteine verursachen eine Reduktion des Silberions Ag^+ zu Ag (Komplexbildung). Die Auswertung der angefärbten Proteinspots ist mittels CCD-Kamera oder Scanner sowie der entsprechenden Software (Bestimmung der Pixelzahl, mit und ohne Abzug des Hintergrundes) möglich (Humphery-Smith et al. 1997). Für die Quantifizierung der gebundenen Proteinmenge ist ebenfalls das Erstellen zugehöriger Eichgeraden notwendig.

J.P.D. Goldring und L. Ravaoli untersuchten die Silberfärbung von Nitrocellulose-Membranen gebundenen Proteinen und zeigten, dass die Sensitivität der Silberfärbung (0,2-0,8 μg), um ein Vielfaches anderen Methoden (2-30 μg) überlegen ist (Goldring und Ravaoli 1996).

2.5.4 Die Bestimmung der UV-Absorbanz

Die Bestimmung der UV-Absorbanz eignet sich ebenfalls zur Ermittlung der Proteinkonzentration [1942 Warburg und Christian (Peterson 1983)]. Für die Messung kommen verschiedene Wellenlängen in Betracht (bei $\lambda = 205 \text{ nm}$ Abhängigkeit von der

Peptidbindung, bei $\lambda = 280$ nm Erfassung der aromatischen Aminosäuren). Die Vorteile der UV-Absorptions-Messung sieht C. M. Stoscheck in der direkten Bestimmung der Absorbanz ohne die Zugabe eines weiteren Reagenzes, der schnellen Durchführung (keine Inkubationszeit) und der linearen Beziehung zwischen Absorbanz und Proteinkonzentration (Stoscheck 1990). Die Beeinflussung der Ergebnisse durch die Anwesenheit bestimmter Substanzen z.B. Puffer kann durch die Überprüfung des Blindwertes kontrolliert werden (Peterson 1983).

Ein Nachteil der Bestimmung der UV-Absorbanz sind die ebenfalls in diesem Bereich auftretenden hohen Absorbanzen von Nukleinsäuren und anderer aromatischer Stoffe. Die Messung bei 205 nm bzw. 210 nm ist für geringere Proteinkonzentrationen (1-100 $\mu\text{g/ml}$) geeignet. Sie weist eine geringere Variabilität von Protein zu Protein auf (Kreusch et al. 2003), ist aber auch empfindlicher, was die Anwesenheit störender Substanzen betrifft (Stoscheck 1990, Kreusch et al. 2003).

2.6 Paralleldialyse

Das Verfahren der Dialyse zählt zu den klassischen Trennverfahren, um Makromoleküle von unerwünschten niedermolekularen Bestandteilen zu trennen. Anwendung findet die Dialyse zum Beispiel in der Entsalzung und dem vollständigen Pufferwechsel von Proben. Das Prinzip der Dialyse beruht auf einer semipermeablen Membran, welche für kleine Moleküle (z.B. gelöste Salze) durchgängig und für große Moleküle (z.B. Proteine) undurchlässig ist. Die üblicherweise genutzten Membranen bestehen aus regenerierter Cellulose (hydrophil). Die Dialysedauer ist abhängig vom Probenvolumen, dem Volumen des Dialysepuffers, dem Konzentrationsgradienten zwischen Probe und Pufferbad, den hydrophilen Eigenschaften der Membran und der Temperatur (www.piercenet.com).

Es existieren verschiedenste Dialysevorrichtungen, welche durch ein Einkammersystem [z.B. Dialyskassetten der Firma Pierce (www.piercenet.com)] gekennzeichnet sind. Dies bedeutet, dass Proben mit einem entsprechenden Volumen im ml-Bereich einzeln dialysiert werden müssen. In den vergangenen Jahren konnte die Dialyse durch eine Verringerung der Vorbereitungszeit und die Steigerung der Probenzahl verbessert werden. So genannte Mikrodialyse-Systeme bzw. parallelisierte Dialysatoren waren zum Zeitpunkt der experimentellen Arbeiten noch nicht vorhanden.

Innerhalb der Gruppe wurde ein Verfahren mit der Bezeichnung „Probenplatten zur Verwendung im Dialysesystem“ (Horn et al. 2001) entwickelt. Ziel war es, eine große Anzahl von Mikroproben von ihnen, die Analyse störenden niedermolekularen Bestandteilen möglichst aufwandgering, effizient und gut handhabbar zu trennen. Viele in der Proteomanalytik verwendete Verfahren setzen eine besondere Probenvorbereitung mit hohen Anforderungen voraus.

Zu diesen Anforderungen gehören:

- Proben mit geringer Salz- oder Detergentienkonzentration,
- Proben liegen im μl -Volumenbereich vor,
- eine parallelisierte Handhabung, um den erforderlichen Probendurchsatz zu erreichen,
- die Behandlung unter standardisierten Bedingungen,
- die Wiederfindung im Prozess der Probenvorbereitung muss hinreichend groß sein,
- zur Analyse ist oft eine schnelle und schonende Konzentrierung der Proben ohne große Verluste notwendig.

Dem Anspruch auf einen hohen Probendurchsatz wird durch die Orientierung am Mikroplattenformat Rechnung getragen. Bei der Probenplatte handelt es sich um eine Kammer zur simultanen Dialyse von 96 Proben im μl -Bereich, welche am oberen Ende offen und am unteren Ende durch in einer Ebene liegende Dialysemembran (geklebt) verschlossen ist. Während des Dialysevorganges erfolgt der Verschluss der Probenplatte am oberen Ende durch einen Deckel oder eine Klebefolie, um eine Verdunstung oder die Kontamination der Proben zu verhindern.

2.7 Aufgabenstellung

In dieser Arbeit sollen folgende Fragen zur Entwicklung eines nativen, mehrdimensionalen Proteom-Trennverfahren untersucht werden:

1. Welches Verfahren ist zur Quantifizierung der Proteinkonzentrationen in den Fraktionen praktikabel und kostengünstig einsetzbar?
2. Ist die entwickelte Dialysevorrichtung zur parallelisierten Probenvorbehandlung geeignet?
3. Lässt sich das Modell-Proteom mit zwei nicht-denaturierenden Trennverfahren ausreichend fraktionieren?

Dazu soll,

1. eine Vielzahl bekannter Proteinbestimmungsmethoden hinsichtlich Empfindlichkeit, linearem Bereich, Praktikabilität, eingesetztem Probenvolumen, Zeitbedarf, Störfaktoren und auf ihre Eignung zur Proteom-Quantifizierung untersucht werden,
2. die Effizienz und Wiederfindung der parallelisierten Dialyse anhand von Modelllösungen überprüft werden,
3. die Trennung des Serumproteoms durch Größenausschlusschromatographie (1. Dimension) und Anionenaustauschchromatographie (2. Dimension) mittels eines 96-fach Polychromatographie-Blockes optimiert werden.

3. Materialien und Methoden

3.1 Technische Ausrüstung

- FPLC-Anlagen
 - a) Pharmacia FPLC System
 - Pump P-500, LCC-500 plus
 - Detektor: Shimadzu, SPD-10A, UV-Vis Detektor
 - Fraktionssammler : Eigenbau (Zentralwerkstatt für Forschung und Entwicklung des Klinikums der Friedrich Schiller Universität Jena)
 - b) Amersham pharmacia biotech - Äkta purifier
 - Box/ pH / C / UV / P 900
 - Fraktionssammler: Frac 950
 - Programm: Unicorn™ 3.10
- Optische Messungen
 - DU®-70 Spektrophotometer (Beckmann)
 - SLT Reader 340 ATTC (SLT Labinstruments)
 - SpectraMax plus 384 (Molecular Devices)
 - Spektrafluor plus (Tecan)
- Mikroplatten
 - U- und Flachboden Mikroplatten
(Greiner, Bestellnummer 650101 bzw. 655101)
 - UV Star® Microplates 96 und 384
(Greiner Bestellnummer 655801 bzw. 781801)
 - Masterblock® 1 ml Polypropylen
(Greiner Bestellnummer 381061)
- Pipettierung
 - CyBi™-Well (CyBio AG Jena)
 - Librarian (OPAL Jena)
- Filtration
 - Filternutschen (Schott)
 - Filtersieb (Merck)
 - Saugflaschen (Schott)
 - Gummidichtung (Merck)
- Schüttler
 - Vortex Genie 2 (Scientific Industries)
 - Titramax 101 (Heidolph Instruments)
 - Type DSG 304M/4 (Bibby Dunn Labortechnik GmbH)
- Küvette
 - Quarzglas Suprasil (Merck)

- Wasseranlage Seralpur pro 90 CN (Seral)
 Seradest SD 6000 (Seral)
- Kamera ImageMaster®VDS (Pharmacia Biotech)
- Scanner Sharp JX330 (Sharp)
 Agfa DuoScan (Agfa)
- CCD Kamera ImageMaster® VDS (Pharmacia Biotech)
- Rührer Ikamag® EOA 9
- Waage Laboratory LC 620 P (Sartorius)
 Analytic AC 210 S (Sartorius)
- Zentrifugen Eppendorf 5403
 Eppendorf 5804 R
- Wärmeschrank MLW, BST 5010
- Kühltruhe Grönland® (-80° C)
- Ultraschallbad UW 4A (VEB Elektrumat Dresden)
- pH-Meter pH-Meter 765 Calimatic (Knick)
 Elektrode: pH-Elektrode SenTix 81 (WTW)
- Osmometer Semi-Micro-Osmometer (Knauer)
- Konduktometer Konduktometer 702 (Knick)
- Software Microsoft® Office
 Phoretix Array 2.0
 OPAL Control
 Soft max Pro 4.0
 Unicorn™ 3.10

3.2 Proteinbestimmung

3.2.1 Materialien

Die folgenden Materialien wurden zur Quantifizierung der Proteinmengen eingesetzt:

- Bradford-Methode Protein Assay (BioRad)
- Biuret-Methode Biuret-Arbeitsreagenz:
 - Kupfersulfat-pentahydrat (Laborchemie Apolda)
 - Kalium-Natrium-Tartat-tetrahydrat (Laborchemie Apolda)
 - NaOH
- Silberfärbung Arbeitsreagenz:
 - Natriumcitrat x 2 H₂O (Merck)
 - FeSO₄ x 7 H₂O (Merck)
 - AgNO₃ (Merck)Säurefixierung: 5 % -ige TCA Lösung
Farbverstärkung: frische 0,1 M Natriumthiosulfat-Lösung
Triton X-100 (Roche)
- Filterpapiere TFN (Filtrak, 180 g/m²)
FN 11 (Filtrak)
SS - No. 2992 (Schleicher & Schüll)
- Membranen NC – Nitrocellulose-Membran
(Sartorius, 0,45 µm, Proteinbindung 115 µg/cm², Dicke 130 µm)

3.2.2 Methoden der Proteinbestimmung

- **Methode nach Bradford**

Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers Bio-Rad. Da dieses Verfahren nur in einem definierten Bereich eine Proportionalität zwischen Proteinkonzentration und Absorbanz aufweist, war das Herstellen von Verdünnungen (von 1:2 bis 1:500) notwendig. Das in den Mikroplatten eingesetzte Probenvolumen betrug 80 µl/well. Die erforderliche Menge an Farbreagenz belief sich auf 25 µl/well. Die Inkubationszeit umfasste 5 min auf dem Schüttler (800 rpm) bei Raumtemperatur. Die Messung der Absorbanz bei 595 nm erfolgte mit dem SLT Reader 340 ATTC.

- **Methode nach Biuret**

Bei der Makrobestimmung betrug das Probenvolumen 1 ml der zu untersuchenden Lösung und 4 ml des Biuret-Arbeitsreagenzes (siehe 3.2.1). Die benötigten Volumina zur Quantifizierung in den Mikroplatten umfassten 40 µl Probe und 160 µl Biuret-Reagenz. Nach kurzem Schütteln (1050 rpm) und einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurde die Absorbanz mit dem Beckmann DU®-70 Spektrophotometer (Makrobestimmung) bzw. dem SLT Reader 340 ATTC (Mikrobestimmung) bei 550 nm gemessen.

- **Silberfärbung**

Für diese Methode wurden die unterschiedlichen Membranen in Größe der Mikrotiterplatten zugeschnitten. Mit dem Gerät Librarian und dem Programm OPAL Control (Cybio AG) als Steuerung wurden parallel 1,5 µl der Proteinlösungen auf die Membran gebracht. Um eine gleichmäßige Trocknung zu erzielen und die Homogenität der Proteinspots zu gewährleisten, wurde die Membran mit einer 0,1% -igen Triton X-100 Lösung vorbehandelt bzw. den Proben zugesetzt. Zur Proteinbindung wurden die Proben auf der Membran bei Raumtemperatur ca. 20 Minuten getrocknet. Im Anschluss wurde eine Säurefixierung in 5%-iger TCA-Lösung für 10 Minuten vorgenommen. Da auch die folgenden Schritte unter Bewegung der Membran in der jeweiligen Lösung erfolgen mussten, wurde auf einem orbitalen Schüttler (400 rpm) gearbeitet.

In einem ersten Waschschrift (dreimalig, 10 Minuten) mit Aqua dest. wurden Salze und wasserlösliche Verunreinigung entfernt. Die Membran kam zur 10 -minütigen Färbung in frisch hergestellte Silberlösung (siehe 3.2.1). In einem zweiten Waschschrift unter Leitungswasser (5 Minuten) wurden die Reste der Silberlösung bis zur Aufhellung des Hintergrundes entfernt. Es war auf gleichmäßiges Entfärben der Membran zu achten. Die Verstärkung der Färbung wurde durch die Inkubation der Membran in ebenfalls frisch hergestellter 0,1 M Natriumthiosulfat-Lösung erzielt (1 min). Die gewässerten Membranen waren sehr reißempfindlich und wurden vorsichtig unter Zuhilfenahme einer Pinzette entnommen. Die Quantifizierung der Farbspots der bei Raumtemperatur getrockneten Membran erfolgte nach dem Scannen (Auflösung 300 dpi) oder der CCD-Kamera-Aufnahme mit dem Auswertprogramm Phorretix Array 2.0.

Die verwendeten Papiersorten und die Nitrocellulose-Membran wurden auf ihren Hintergrund, Spothomogenität, Sättigungsgrad und Handhabbarkeit untersucht.

Bei der Untersuchung des Hintergrundes wurden die Papiere ohne vorheriges Aufbringen einer Proteinlösung den entsprechenden Wasch- und Färbeschritten unterzogen. Der Messung lag ein Raster von 4 x 4 gleichmäßig verteilten Spots (5 mm) zugrunde.

Die Homogenität der Proteinfärbung auf den Membranen wurde überprüft, in dem diese in frisch hergestellte BSA-Lösung mit einer Konzentration von $c = 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ (Puffer: Phosphatpuffer mit 0,5% Triton X-100) gelegt und anschließend der Silberfärbung unterzogen wurden. Die erfassten 16 Messwerte befanden sich wie bei dem Hintergrundtest gleichmäßig auf der Membran verteilt (Raster 4 x 4, Spotdurchmesser 5 mm).

Die Spot-Homogenität wurde bei einem Spotvolumen von $1,5 \mu\text{l}$ getestet. Die eingesetzte BSA-Konzentration betrug $150 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Für die Auswertung der Homogenität wurde jeweils der gesamte Spot betrachtet. Verglichen wurden die Ergebnisse ohne Vorbehandlung der Membran und unter Verwendung einer 0,1% -igen Triton X-100 Lösung.

- **Bestimmung der UV-Absorbanzen**

Die Bestimmung der Absorbanzen erforderte ein Übertragen der Proben mittels CyBi™-Well in spezielle UV Star® Microplates 96 bzw. 384 der Firma Greiner. Das ermittelte optimale Volumen für die Quantifizierung betrug 75 bzw. $30 \mu\text{l}$ (Kreusch et al. 2003). Die anschließende Messung mit dem SpectraMax plus 384 schloss das Spektrum sowie Messungen bei einzelnen Wellenlängen von 205, 215 und 280 nm ein.

Die Auswertung der bei der Proteinbestimmung gewonnen Daten erfolgte mit dem Programm Microsoft® Excel.

3.3 Dialyse

3.3.1 Aufbau der Dialysekammer

Ebenfalls auf das Format der Mikroplatten abgestimmt wurde eine Dialysekammer entwickelt (Anfertigung in der Zentralwerkstatt der Friedrich Schiller Universität Jena). Die aus Kunststoff bestehende Kammer mit 96 Bohrungen (1, Abb. 3 / Durchmesser von 7,3 mm) wurde einseitig mit einer Nitrocellulose-Membran (Millipore; 0,025 μm ; white VswP; 42mm; Kat. No. VSWP 14250) beklebt (Heißkleber: Glue Sticks® der Firma C.K.). Die Abbildungen 3 und 4 zeigen die Skizzen der Dialysekammer.

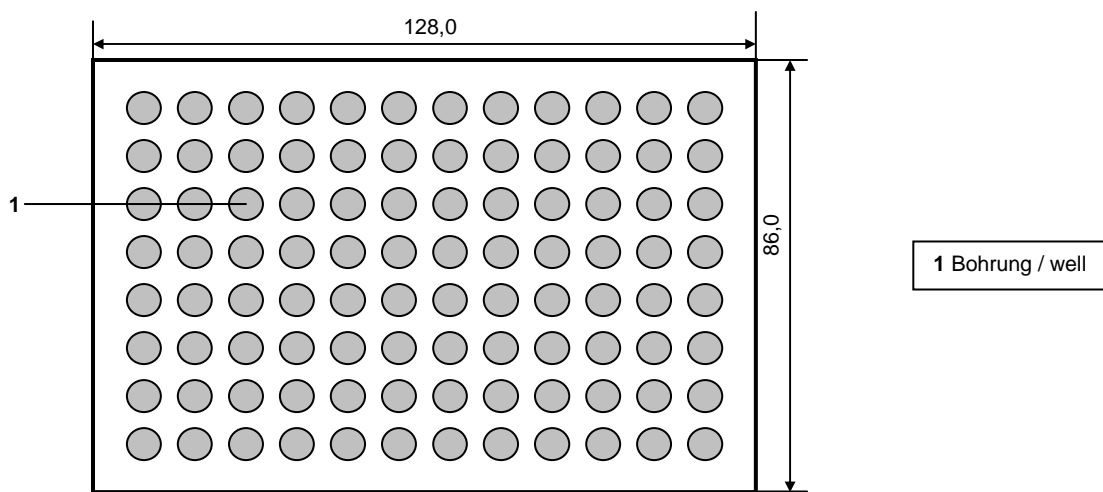


Abb.3: Skizze der Dialysekammer (Aufsicht, Angaben in mm)

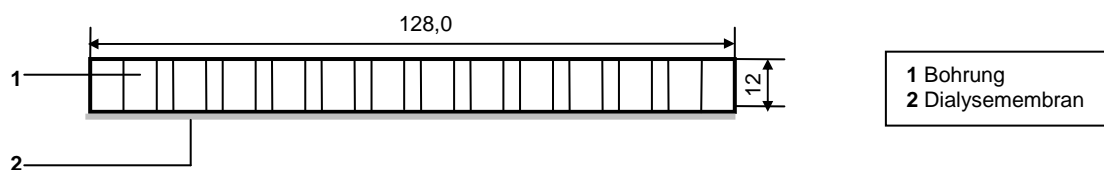


Abb.4: Skizze der Dialysekammer (Vorderansicht, Angaben in mm)

3.3.2 Kontrolle der Kreuzkontamination

Zur Kontrolle der Kreuzkontamination wurden die einzelnen Spalten der Dialysekammer alternierend mit para-Nitrophenollösung und einer DEP-Lösung (Diethanolamin, $c = 50 \text{ mM}$ / $\text{pH} = 9,8$ / Firma Fluka, Reinheitsgehalt von $> 99,0\%$) gefüllt. Das Probenvolumen betrug $100 \mu\text{l}$ je well bei einer Dialysedauer von 60 min gegen 400 ml Aqua dest.. Die Entnahme der

Proben und die anschließende Messung der Absorbanz bei 405 nm erfolgte bei einem Volumen von 50 µl in den 384-er UVStar-Platten der Firma Greiner.

3.3.3 Dialyse gegen Aqua dest.

Vor der Weiterverwendung, der in der Größenausschlußchromatographie (1. Dimension) gewonnen Fraktionen, wurden diese mit Hilfe der Dialysekammer entsalzt. Als Verdunstungsschutz wurde die Kammer mit selbstklebender Folie abgedeckt.

Zu den Vorbereitungen des Dialysevorganges zählen die Schritte:

- Wiegen der Dialysekammer (leer und gefüllt)
- Wässern der Dialysekammer in Aqua dest.
- Füllen der Dialysekammer mit 200 µl Fraktion je well.

Bei der Durchführung der Dialyse gegen Aqua dest. wurden zwei unterschiedliche Verfahren angewendet:

- **Dialyse gegen fließendes Aqua dest.**

Bei dieser Versuchsanordnung wurde die gefüllte Dialysekammer mit einer speziellen Halterung an einem Schüttler von Bibby Dunn Labortechnik GmbH (4 rpm) mit Schrauben befestigt. Die Halterung wurde in einen Behälter mit Aqua dest., welcher eine Ablaufvorrichtung besaß, überführt. Dabei befand sich die Membran der Dialysekammer ca. 5 mm tief im Wasserbad. Der Wechsel des Aqua dest. erfolgte hierbei ständig über einen Zu- und Abfluss.

- **Dialyse gegen Aqua dest. im ein- oder mehrmaligem Austausch**

Die Dialysekammer wurde in eine selbst angefertigte Schwimmvorrichtung integriert, welche sich in einem Behälter gefüllt mit Aqua dest. befand. Der Austausch des Aqua dest. (Volumen 2 Liter) erfolgte nach 1 bzw. 2 Stunden. Zusätzlich wurde zwecks

Umwälzung des Wasserbades mit einem Magnetrührer gearbeitet. Die Eintauchtiefe der Dialysekammer betrug ca. 5 mm. Die Anordnung zur Dialyse ist in der Abb. 5 zu sehen.

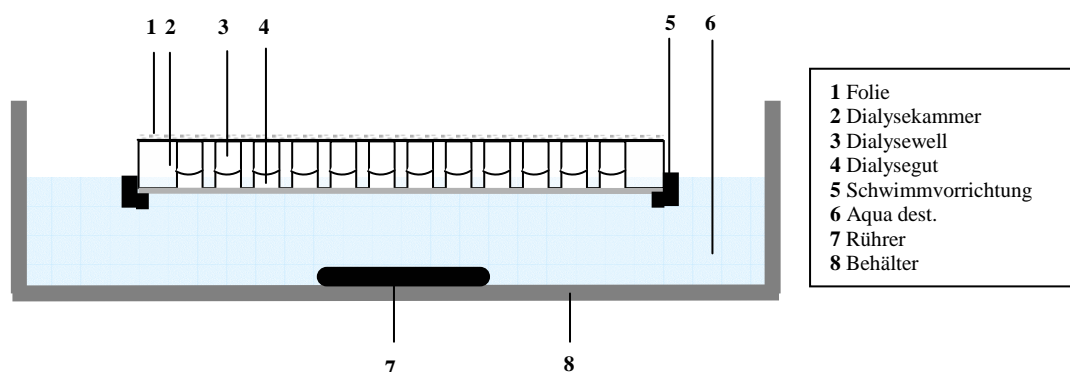


Abb.5: Anordnung der Dialysekammer (Seitenansicht)

Die Proben wurden nach variablen Dialysezeiten und der sich anschließenden Gewichtsbestimmung entnommen. Zur Messung der Absorbanz mit dem SpectraMax plus 384 (Molecular Devices) wurden 150 µl der Proben entnommen und in UV Star® Microplates 96 pipettiert.

3.3.4 Dialyse gegen Pufferlösung

Bei der Dialyse gegen den entsprechenden Puffer (z.B. Tris oder PBS) wurde analog der Dialyse gegen Aqua dest. im ein- oder mehrmaligem Austausch des Pufferbades vorgegangen. Das verwendete Probenvolumen betrug 200 µl je well. In den Schwimmvorrichtungen wurden je zwei Dialysekammern gleichzeitig gegen 2 Liter Puffer dialysiert. Nach einer Stunde erfolgte ein Austausch des Puffers. Die gesamte Zeitdauer der Dialyse betrug 2 Stunden. Die dialysierten Fraktionen wurden entweder sofort zur Trennung in der 2. Dimension eingesetzt oder bei -80°C tiefgefroren gelagert.

- **Prüfung der Dialysegeschwindigkeit**

In alle Wells der Dialysekammer wurden 200 µl einer Probelösung (600 µM p-Nitrophenol, 150 mM NaCl in 10 mM Tris/HCl, pH = 7,4) eingefüllt und danach 4,5 h gegen 2 l 10 mM Tris/HCl (pH = 7,4) dialysiert. Nach 1, 2 und 4,5 h wurde der gesamt

Wellinhalt von jeweils 8 bzw. 16 wells entnommen. Mit der Hälfte der Proben wurde die p-Nitrophenolkonzentration ermittelt. Dazu wurden die Proben 1:2 bis 1:10 in 0,1 M Phosphatpuffer, pH 11,0 verdünnt. 50 µl davon wurden in 384-well-Platten pipettiert und die Absorbanzen gegen einen Puffer-Blindwert bei 405 nm mittels Absorbanzreader gemessen. In den anderen Proben wurde die Osmolarität anhand der Gefrierpunktniedrigung in einem Osmometer (Knauer, Semi-Micro Osmometer Typ ML) gemessen. Unter Zuhilfenahme einer dazugehörigen Eichreihe mit variablen NaCl-Konzentrationen in 10 mM Tris/HCl konnten die NaCl-Konzentrationen errechnet werden.

3.4 Materialien und Methoden der 1. Dimension

3.4.1 Chromatographische Trennsäule

Zur Durchführung der Proteintrennung in der 1. Dimension in Form einer Größenausschlußchromatographie wurde eine standardisierte, kommerziell erhältliche Trennsäule HiLoadTM 16/60 – SupderdexTM 200 – prep grade (Code No.17-1069-01, ID No.9902017) der Firma Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Die Eckdaten der Säule sind eine Partikelgröße von Ø 34 µm, ein Säulenvolumen von 120 ml, ein mögliches Probenvolumen von ≤ 5 ml und eine Trennung von Proteingemischen im Bereich von 1×10^4 – 6×10^5 bei einem Druck von $\leq 0,5$ MPa. Eingesetzt wurde die Trennsäule mit der FPLC-Anlage Äkta purifier ebenfalls von der Firma Amersham Pharmacia Biotech.

3.4.2 Eichung

Die Eichung der Trennsäule erfolgte unter Verwendung der Eichproteine der HMW und LMW Gel Filtration Calibration Kits der Firma Pharmacia Biotech. Die genauen Angaben zu den eingesetzten Proteinen sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Außerdem wurde Albumin Fraktion V aus Rinderserum (MG = 67000 Da, Serva No. 11932) und Humanserum (MG = 69000 Da, Serva No. 11860) verwendet. Die Anwesenheit aromatischer Aminosäuren in den zur Eichung verwendeten Proteinen ermöglichte eine „online“ Detektion bei 280 nm.

Zur Bestimmung des Ausschlussvolumens wurde in einem 1. Lauf Blue Dextran 200 (1 ml, 7 mg/ml) aufgebracht. Zur Erstellung einer Eichgeraden bezüglich der Proteingröße (Molekulargewicht) zum jeweiligen Elutionsvolumen wurden 2 weitere Trennungen mit folgenden Proteinen durchgeführt:

- 2. Lauf: Aldolase – Ferritin – Ribonuklease (RNase)
- 3. Lauf: Thyreoglobulin – Chymotrypsinogen – Albumin.

Tab.1: Eichproteine

Protein	Quelle	Molekulargewicht	Konzentration
Aldolase	Hasenmuskel	158000	6,8 mg/ml
Ferritin	Pferdemilz	440000	3,6 mg/ml
Thyreoglobulin	Rinderschilddrüse	669000	12,8 mg/ml
Ribonuklease A	Rinderpankreas	13700	3,2 mg/ml
Chymotrypsinogen	Rinderpankreas	25000	3,0 mg/ml
Blue Dextran 200		2000000	7 mg/ml

Nach der Einwaage wurden die Eichproteine in 1 ml Puffer (siehe 3.1.4) gelöst und anschließend bei 10.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der entstandene Überstand wurde abpipettiert, die Proteinlösungen zu gleichen Teilen gemischt und nochmals für 10 min zentrifugiert. Das aufgetragene Probenvolumen betrug jeweils 1 ml.

3.4.3 Serum

Das während der Versuche genutzte humane Serum wurde von einem gesunden, freiwilligen Spender (Mitarbeiter, 28 Jahre, weiblich) gewonnen. Die Gerinnungszeit betrug 10 – 12 Stunden (über Nacht) bei einer Temperatur von 4° C. Die Zentrifugation erfolgte bei 3500 rpm für eine Zeitdauer von 10 min. Das überstehende Serum wurde abpipettiert und entweder sofort oder nach Tiefrieren (– 80°C gelagert) verwendet.

Vor der Größenausschlusschromatographie wurde eine Verdünnung von 1:2 oder 9:10 des Serums (Puffer siehe 3.4.4) hergestellt und eine Zentrifugation bei 10.000 rpm für 10 min durchgeführt. Die benötigte Probenmenge für eine Trennung betrug 1 ml und konnte über die dafür vorgesehene Probenschleife (Fassungsvermögen 1 ml) aufgebracht werden. Die

unterschiedlichen Seren und Trennungen wurden zur besseren Übersichtlichkeit mit der Kurzbezeichnung „Serum 1 -8“ versehen.

3.4.4 Lösungen und Chemikalien

Die Tabelle 2 zeigt die verwendeten Pufferlösungen der 1. Dimension mit den zugehörigen Konzentrationen gelöster Substanzen. Die Salze wurden von der Firma Merck und Triton X-100 von Roche zur Verfügung gestellt.

Tab.2: Pufferlösungen der 1.Dimension, pH=7,4

Abkürzung	Substanzen	Konzentration
Phosphatpuffer	K_2HPO_4	10 mM
10 x PBS	10 x Phosphat Buffered Saline ($NaH_2PO_4 \times H_2O$ Na_2HPO_4 NaCl)	0,015 M 0,081 M 1,45 M
10 x PBS + Triton X-100 (0,1 bzw. 0,2 %)	10x Phosphat Buffered Saline ($NaH_2PO_4 \times H_2O$ Na_2HPO_4 NaCl)	0,015 M 0,081 M 1,45 M
1 x PBS	1x Phosphat Buffered Saline ($NaH_2PO_4 \times H_2O$ Na_2HPO_4 NaCl)	1,5 mM 8,1 mM 0,145 M
1 x PBS + Triton X-100 (0,1 bzw. 0,2 %)	1x Phosphat Buffered Saline ($NaH_2PO_4 \times H_2O$ Na_2HPO_4 NaCl)	1,5 mM 8,1 mM 0,145 M

Die Einstellung des pH-Wertes (pH = 7,4) der Pufferlösungen erfolgte wenn nötig, mit Natriumhydroxid (NaOH) und Salzsäure (HCl). Die Pufferlösungen wurden für 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

3.4.5 Durchführung

Die Trennsäule wurde mit der mehr als dreifachen Menge des Gesamtvolumens (3x120 ml) equilibriert. Es wurde jeweils 1 ml Serum (1:2 bzw. 9:10 verdünnt, zentrifugiert) bei einer Flussrate von 1 ml/min und einem Fraktionsvolumen von 1 ml getrennt. Das Säulenausschlussvolumen ($V_T = 44$ ml) wurde verworfen. Die ersten gesammelten Fraktionen (ab $V = 37$ ml) dienten zum einen der Sicherheit und zum anderen konnte auf diese Weise der Blindwert des verwendeten Puffers bei den sich anschließenden Messungen bestimmt werden. Die Fraktionierung endete bei einem Elutionsvolumen von 132 ml. Die gewonnenen Fraktionen wurden zum Teil sofort oder nach Tieffrieren (-80°C) weiterverwendet.

3.5 Materialien und Methoden der 2. Dimension

3.5.1 Chromatographische Matrix

Zur Trennung in der 2. Dimension wurde eine Anionenaustauschchromatographie eingesetzt. Als Säulenmatrix wurde DEAE-Cellulose SERVACEL® analytical grade von der Firma Serva mit einer Partikelgröße 100-200 μm verwendet.

3.5.2 Aufbau des Polychromatographen

Der Trennvorgang erfolgte mit dem in unserer Gruppe entwickelten Polychromatographie-Block (PCG), welcher in der Zentralwerkstatt für Forschung und Entwicklung des Klinikums der Friedrich Schiller Universität Jena angefertigt wurde. Während der Versuche wurden verschiedene Varianten sowohl eingesetzter Trennmedien als auch der Trennblöcke getestet. Die Anordnung der 96 Minisäulen entspricht dem Mikroplatten-Format und ermöglicht die gleichzeitige Trennung von 96 Proben. In der Abb.6 ist ein solcher Polychromatograph beim Pipettiervorgang abgebildet.

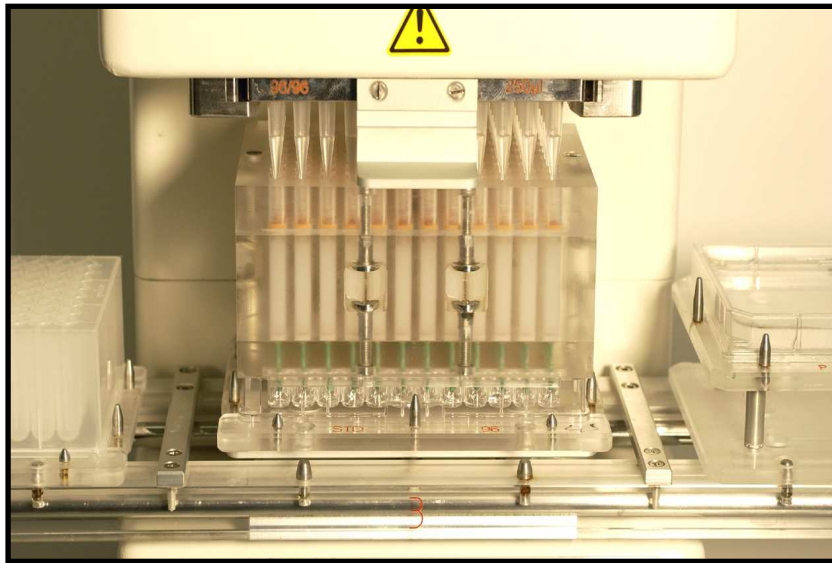


Abb.6: Polychromatograph (PCG) beim Pipettiervorgang

Der Polychromatograph besteht aus einem oberen Kopfteil (5, Abb. 7) und dem eigentlichen Block (6, Abb. 7). Das Kopfteil besitzt 96 Wells zur Aufnahme von Proben (1, Abb. 7) und wird über Schrauben am Block fixiert. Somit ist eine direkte Übertragung der Proben und Eluenten auf die einzelnen Miniatursäulen im Block (3, Abb.7) möglich. Die Wells und Miniatursäulen haben einen Durchmesser von 7,3 mm (Säulendurchmesser). Die Länge der Säulen beträgt 33 mm, woraus sich ein Säulenvolumen von $1,38 \text{ cm}^3$ ergibt. Die Abgrenzung der Trennmatrix erfolgt über Fritten (2, Abb. 7), welche aus aufgeschäumtem PVC bestehen.

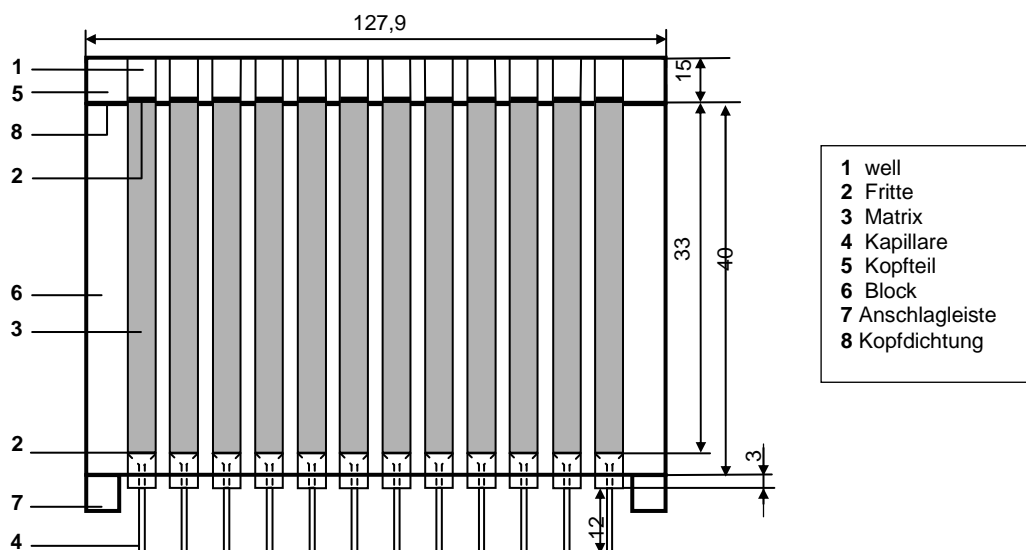


Abb.7: Skizze des Polychromatographen (Vorderansicht, Angaben in mm)

Der Fluss erfolgt über angebrachte Kapillaren (4, Abb. 7) in Mikroplatten. Zur Positionierung des Polychromatographen auf die Mikroplatten dienen zwei am Block fest angebrachte Anschlagleisten (7, Abb. 7).

In den 96 Minisäulen befindet sich die DEAE-Cellulose SERVACEL® analytical grade (3, Abb. 4). Die notwendigen Schritte der Auf- und Vorbereitung der DEAE-Cellulose sind unter dem Punkt 3.5.5 beschrieben.

3.5.3 Achterblock

Für Testversuche in der Erprobung wurden kleinere Blöcke angefertigt (Zentralwerkstatt für Forschung und Entwicklung des Klinikums der Friedrich Schiller Universität Jena). Diese umfassten 8 Säulen in einer Reihe, weshalb dieser auch als Achterblock bezeichnet wird. Durch das Versetzen des Blockes nach jedem Elutionsschritt können 12 Fraktionen jeder Säule in die 12 wells der zugehörigen Reihe einer Mikroplatte (U-Boden) eluiert werden (Abb.8).

Im Unterschied zum Polychromatographen ist keine Trennung in Kopfteil und Block vorhanden. Die Fritten wurden nach dem Füllen direkt auf die Matrix aufgelegt.

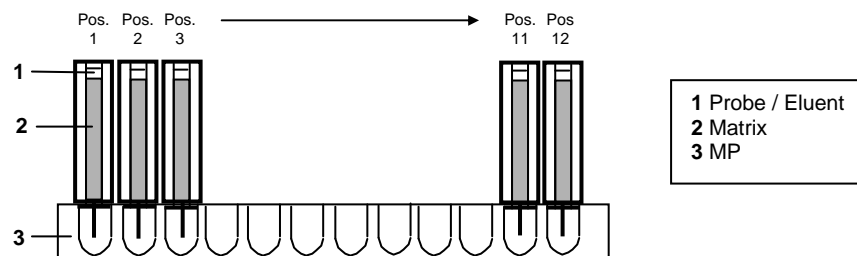


Abb.8: schematische Darstellung der unterschiedlichen Positionen des 8-er Blockes während der Elution

3.5.4 Lösungen und Chemikalien

Die Tabelle 3 zeigt die verwendeten Pufferlösungen der 2. Dimension mit den zugehörigen Konzentrationen gelöster Substanzen (Hersteller: Merck, Triton X-100 von Roche). Die Vorgehensweise der pH-Wert Einstellung und Entgasung entsprach denen der 1. Dimension (siehe 3.4.4).

Tabelle 3: Pufferlösungen 2.Dimension, pH=7,4

Abkürzung	Substanzen	Konzentration
10 mM Tris + NaCl	Tris(hydroxymethyl)aminmethan MgCl ₂ ZnSO ₄ x 7H ₂ O NaCl	10 mM 1 mM 0,025 mM 0 – 800 mM
Tris + NaCl	Tris(hydroxymethyl)aminmethan NaCl	10 mM 150 mM
10 x PBS + Triton X100 (0,01 bzw.0,25%)	10 x Phosphat Buffered Saline (NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O Na ₂ HPO ₄ NaCl)	0,015 M 0,081 M 1,45 M
10 x PBS + Propanol	10x Phosphat Buffered Saline (NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O Na ₂ HPO ₄ NaCl) Propanol	0,015 M 0,081 M 1,45 M 20 bzw. 40 %
Phosphatpuffer	K₂HPO₄	10 / 50 / 100 mM

3.5.5 Vorbereitung des Polychromatographen

- Vorbereitung der DEAE-Cellulose SERVACEL® analytical grade**

Zur Füllung eines Polychromatographen wurde eine DEAE-Cellulose Suspension von ca. 300 ml benötigt. Die Cellulose wurde in einem Becherglas zunächst mit Aqua dest. gequollen. Die Quellzeit der DEAE-Cellulose betrug mindestens 60 min. Der Überstand wurde anschließend vorsichtig dekantiert. Danach wurde entsprechend der Herstellerangabe nacheinander mit 0,5 M Natriumhydroxid und 0,5 M Salzsäure equilibriert. Im Anschluss wurde mit dem später verwendeten Puffer equilibriert. Das Suspensieren und Dekantieren mit Puffer wurde mehrfach wiederholt. Danach schloss sich ein Waschen mit Puffer unter Rühren durch eine Fritte mit Perlonsieb an. Dadurch konnten weitere kleinere unerwünschte Bestandteile entfernt werden. Der pH-Wert wurde nach dem Waschen überprüft. Die Suspension wurde vor der Verwendung im Ultraschallbad für 30 min entgast.

- **Füllen des Polychromatographen**

Zur Füllung des Polychromatographens wird das Kopfteil vom Block entfernt. Ein der entsprechenden Größe angefertigter Rahmen kann ebenfalls über die gleichen Bohrungen mittels Schrauben fixiert werden. Ein Wegfließen der Matrix beim Füllen kann auf diese Weise verhindert werden.

Um eine blasenfreien Füllung zu ermöglichen, musste der Polychromatograph zunächst mit Aqua dest. gefüllt werden. Die Suspension der Matrix wurde nun homogen und blasenfrei eingefüllt. Durch das Abtropfen des Puffers über die Kapillare einer jeden Säule setzte sich die DEAE-Cellulose ab. Wenn alle Säulen gleichmäßig und ohne Lufteinschlüsse gefüllt waren, konnten die Überschüsse der Suspension durch Abstreichen entfernt werden. Dem Verschluss des PCG diene das mit Fritten versehene und gewässerte Kopfteil (5, Abb. 7).

3.5.6 Prüfung des Polychromatographen

Das Laufverhalten der Trennsäulen wurde mit folgenden Farbstoffen überprüft:

- Methylenblau (C.I. 52015 / Merck)
- Kupfersulfat (VEB Laborchemie Apolda)
- Bromthymolblau (Merck)
- Alizarinrot (05570 / Fluka)
- Alizarinrot (05600 / Fluka)

3.5.7 Ablauf des Trennvorganges

Das Eindringen und Durchlaufen von Proben bzw. Eluenten erfolgt durch Gravitation. Es wurde kein zusätzlicher Druck ausgeübt. Um einen gleichmäßigen Fluss durch die Säulen des Polychromatographen nach einer Lagerung im Kühlraum wieder herzustellen, war ein mehrmaliges Spülen mit dem zur Trennung verwendeten Puffer notwendig. Es wurden 200 µl Puffer je well und Elutionsschritt aufgebracht. Zur Serumproteintrennung in der 2. Dimension wurden 150-500 µl der dialysierten Proben aus der Trennung der 1.Dimension aufgegeben. Die Elution erfolgte schließlich durch den Puffer und diesem zugesetzten Substanzen (NaCl,

Propanol / Tab. 9 und 10 Seite 54 bzw. 55). Die gewonnen Einzelfractionen wurden in Mikroplatten gesammelt.

3.6 Eingesetzte Formeln

Tab.4: eingesetzte Formeln

Funktionen	Gleichungen
Mittelwert (\bar{x})	$\bar{x} = 1/n (x_1 + x_2 + \dots + x_n)$
Standardabweichung (s)	$s = \sqrt{\sum (x_i - \bar{x})^2 / n-1}$
Variationskoeffizient (v_k)	$v_k = (s / \bar{x}) * 100\%$

4. Ergebnisse

4.1 Proteinbestimmungsmethoden

Zur vollständigen Charakterisierung eines Proteoms sind nach der Trennung des Proteingemisches, die Quantifizierung und Identifikation der Proteine notwendig. Da es sich um Proteinkonzentrationen in einem großen dynamischen Bereich, geringe Volumina und eine große Probenzahl handelt, stellte die Wahl der Proteinbestimmungsmethode einen kritischen Punkt dar. Deshalb sollten verschiedene Quantifikationsmethoden auf ihre Anwendbarkeit getestet und gegebenenfalls optimiert werden. Die Methoden unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Sensitivität, Genauigkeit, Praktikabilität, benötigtes Probenvolumen, Zeitbedarf, Kosten und Empfindlichkeit gegenüber störenden Substanzen.

4.1.1 Standardmethoden

Einen Vergleich der Standardmethoden in Bezug auf den dynamischen Bereich, die Sensitivität, den Aufwand, das notwendige Probenvolumen, die Praktikabilität sowie störende Substanzen ist der Tabelle 5 (Seite 34) zu entnehmen. Die Daten dieser Tabelle wurden speziell für die Durchführung in Mikroplatten erarbeitet.

- **Proteinbestimmung mittels Bradford-Methode**

Die Proteinkonzentrationen in den gewonnenen Serumfraktionen der 1. Dimension wurden zum Teil nach der Bradford-Methode bestimmt. Der erzielte dynamische Bereich von 10-100 µg/ml bzw. 0,8-8 µg/well begrenzen die Verwendung der Methode für die Proteom-Quantifizierung. Der geringe lineare Bereich dieser Proteinbestimmungsmethode machte eine Verdünnung der Serumfraktionen notwendig (siehe 3.2.2). Die dazu erforderlichen Pipettierungen sowie die Inkubationszeit (5 min) und Auswertung (ca. 30 min) bestimmten den Zeitbedarf von ca. 60 min.

Nachteilig erwies sich außerdem die Tatsache, dass pro Messung 80 µl der Probe benötigt wurden, welche einer weiteren Charakterisierung nicht mehr zugänglich waren. Hinzu kommt die Störanfälligkeit dieser Methode durch gängige Reagentien wie z.B. Triton X-100, Propanol, Ammoniumsulfat und Natriumchlorid. Die entstehenden Kosten für eine

Messung sind abhängig von der Vielfachheit der Bestimmung und betrugen pro Mikrobestimmung ca. 3 Cent pro Probe.

- **Proteinbestimmung mittels Biuret-Methode**

Die Chelatbildung zwischen Proteinen und Kupfer-Ionen (Biuret-Reaktion) weist eine Linearität im Bereich von 100-10000 $\mu\text{g/ml}$ bzw. 4-400 $\mu\text{g/well}$ auf. Hieraus resultiert eine bessere Eignung zur Bestimmung der hohen Proteinkonzentration im Ausgangsserum.

Von Nachteil ist wie bei der Bradford-Methode, dass die Proben durch die Reaktion mit der Farblösung keinen weiteren analytischen Schritten zugeführt werden konnten. Der Zeitbedarf betrug einschließlich einer Inkubationszeit von 20 min insgesamt 75 min. Von Vorteil ist, dass vergleichsweise geringere Probenvolumen von 40 μl . Die Kosten für diese Proteinbestimmung fallen durch die Verwendung der Kupfersulfatlösung gering aus. Als störende Substanz musste lediglich Ammoniumsulfat beachtet werden.

Anhand des „Serums 3“ sollte die Quantifizierung mittels Biuret-Methode erprobt werden. Es wurden die unverdünnten Fraktionen sowie die 1:2 verdünnten Fraktionen verwendet. Die Abb. 9 zeigt die Ergebnisse nach Absorbanzmessung bei 550 nm. Die Messungen lassen kaum Unterschiede zwischen den unverdünnten und verdünnten Fraktionen erkennen.

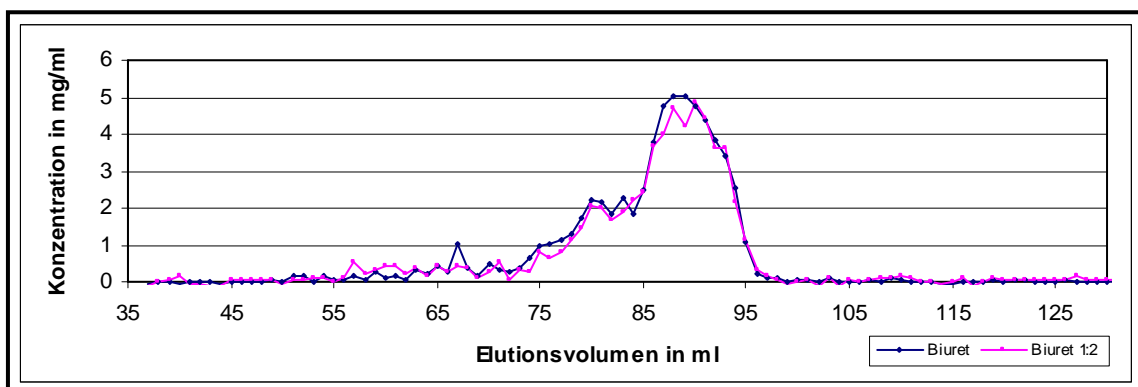


Abb.9: Proteinbestimmung mittels Biuret-Methode am Beispiel der Serumentrennung
(„Serum 3“ / 1. Dimension / Tris-Puffer)

Tabelle 5: Übersicht der Proteinbestimmungsmethoden

KRITERIEN	BIURET-Methode	BCA/KBCA (BICINCHRONIC ACID)	LOWRY-Methode	BRADFORD
Empfindlichkeit => in µg/well => in µg/ml (Probe)	ab 4 ab 100	ab 0,5 ab 5	ab 1 ab 200	ab 0,8 ab 10
Linearer Bereich in => µg/well => µg/ml (Probe) => Extinktionswerte MP	4 – 400 100 - 10000 OD ₅₅₀ : 0,05-0,3	0,5 – 10 5 – 100 OD ₅₅₀ : 0,22-1,98	1 – 5 200 – 1000 OD ₆₂₀ : =0,037-0,25	0,8 – 8 10 – 100 OD _{620/405} : 0,7-3,3
Eingesetztes Probenvolumen	40 µl Probe (Mikrobestimmung)	100 µl Probe (Mikrobestimmung)	5 µl (Mikrobestimmung) 100 µl (Makrobestimmung)	80 µl (Mikrobestimmung)
Zeitbedarf der Bestimmung	- 20 min Verdünnung + Pipettierung - 20 min Inkubation - 5 min Messung (SLT-Reader) - 30 min Auswertung	- 20 min Verdünnungsreihe + Pipettierung - 60 min Inkubation - 15 min Abkühlung - 5 min Messung (SLT-Reader) - 30 min Auswertung	-20 min Verdünnungsreihe + Probenansatz (Pipettierung) -15 min Inkubation -20 min Messung –Beckman -5 min Messung (SLT-Reader) -30 min Auswertung	- 20 min Verdünnungsreihe + Pipettierung - 5 min Inkubation - 5 min Messung (SLT-Reader) - 30 min Auswertung
Gesamt	<u>75min</u>	<u>130min</u>	<u>90min</u>	<u>60min</u>
Störende Substanzen (Literaturdaten)	-Ammoniumsulfat	-0,425M Ammoniumsulfat -1M Natriumphosphat	- hinzufügen von 20µl Reagenz pro ml, wenn Detergentien enthalten (z.B. Triton X-100) - reduzierende Reagenzien	- Triton X-100 (0,05%) - Propanol (>5%) - 1 M Ammoniumsulfat - 5 M Natriumchlorid - 1 M Phosphat - 0,1% SDS
VKs ± STABW ¹	3,6 % ± 1,65%	6,8 % ± 5,1%	21,7 % ± 20%	4,3 % ± 1,7%
Mittelwert und Streuung ausgewählter Wert	für 2000 µg/ml: OD ₅₅₀ =0,112±0,003 (2,9%)	für 20 µg/ml OD ₅₅₀ =0,65±0,043 (6,5%)	für 1500 µg/ml OD ₆₂₀ =0,2±0,014 (6,5%)	für 50 µg/ml OD _{620/405} =2,44±0,158 (6,4%)
Optimale Meßwellenlänge	550 nm	562 nm	650 nm	595 nm
Haltbarkeit Farbreagenz	8h	8h	1h	1h

¹ Die Werte sind die mittleren VK-Werte aus 7 Messpunkten über den gesamten linearen Bereich, die jeweils 8-fach bestimmt wurden.

4.1.2 Proteinbestimmung durch Silberfärbung

Die Anwendung der Silberfärbung stellt in der Analyse elektrophoretisch getrennter Proben eine gängige Methode dar und sollte für die Quantifizierung chromatographisch getrennter Proteine optimiert werden. Die Vorteile der Silberfärbungen gegenüber den Standardmethoden liegen bei einer hohen Sensitivität (im ng-Bereich), einem relativ großen dynamischen Bereich (Linearität von 5-100 ng/μl) und einem geringen Probenvolumen (1 μl) (Sedmak und Grossberg 1977). Die Kompatibilität mit den Mikroplatten und dem Pipettiersystem CyBi™-Well (CyBio AG Jena) ist gegeben.

Um eine Optimierung der Proteinbestimmung durch eine Silberfärbung zu erreichen, wurden im Rahmen der Arbeit unterschiedliche Papiertypen, Färbeabläufe, Auswertmethoden und verwendete Substanzen erprobt. Von den handelsüblichen Papieren wurden die TFN und FN 11 Membranen der Firma Filtrak, die Membran No.2992 der Firma Schleicher & Schüll und eine Nitrocellulose-Membran der Firma Sartorius verwendet. Die Papiersorten wurden hinsichtlich Hintergrund-Färbung, Spothomogenität und Handhabbarkeit nach den im Kapitel Materialien und Methoden (siehe 3.2.2) aufgeführten Wasch- und Färbeschritten untersucht.

- **Hintergrund-Färbung**

Ziel des Hintergrundtest war es, die individuellen Messwerte der Membranen nach Färbung ohne Protein zu bestimmen. Die Tabelle 6 zeigt die ermittelten Werte (Scanner und CCD-Kamera) für die verschiedenen Papiersorten und deren deutlichen Unterschiede im Bezug auf ihren Hintergrund.

Tab. 6: Silberfärbung - Hintergrund der Papiersorten

(MW = Mittelwert der im Auswertprogramm im Spot errechneten Pixel / StaAb = Standardabweichung / VK = Variationskoeffizient / Membranen: FN = FN 11 Membran – Filtrak, TFN = TFN-Membran – Filtrak, NC = Nitrocellulose-Membran, S&S = Schleicher & Schüll)

Membran	CCD - Kamera			Scanner		
	MW	StaAb	VK %	MW	StaAb	VK %
FN 11	8701,44	7314,27	84,06	0,94	1,56	165,95
TFN	66299,06	27184,39	41,00	1042,44	776,42	74,48
NC	123092,50	17402,89	14,14	31,19	61,71	197,85
SS	1078,06	1976,13	183,30	4,75	5,27	110,95

- **Homogenität der Membranen (Gesamtfärbung)**

Die Abb.10 veranschaulicht die Ergebnisse (Scanner) nach erfolgter Silberfärbung bei vollständiger BSA-Sättigung ($c = 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ / Puffer: Phosphatpuffer mit 0,5% Triton X-100) der Papiere bzw. der Membran. Die genaue Vorgehensweise wird unter 3.2.2 beschrieben.

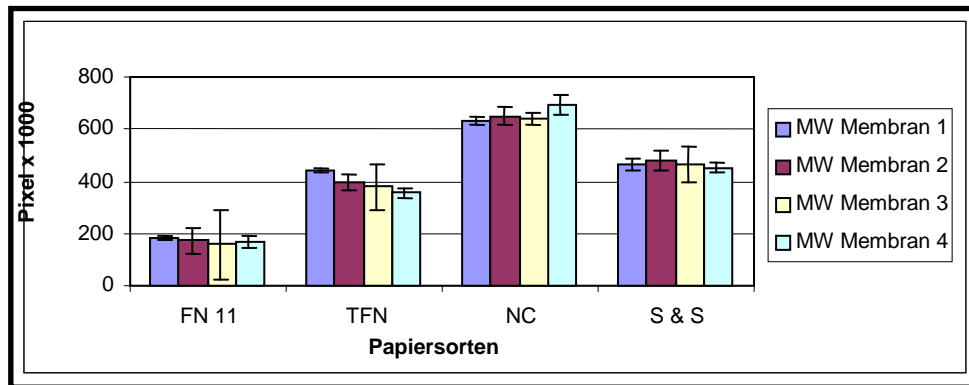


Abb.10: Silberfärbung – Bestimmung der Membran-Homogenität mit BSA-Lösung
($c = 100 \text{ } \mu\text{g}/\text{ml}$ / Auswertung: Scanner / Programm: Phoretix Array 2.0 / MW = Mittelwert, FN = FN 11 Membran - Filtrak, TFN = TFN Membran - Filtrak, NC = Nitrocellulose-Membran, S&S = Schleicher & Schüll)

- **Spot-Homogenität – Vergleich mit und ohne Membranvorbehandlung**

Die Abb.11 gibt die ermittelten Werte (Scanner und CCD-Kamera) mit zugehörigem Variationskoeffizienten wieder. Man sieht, dass mit dem Zusatz von Triton X-100 keine durchgängig besseren Präzisionen erzielt werden konnten.

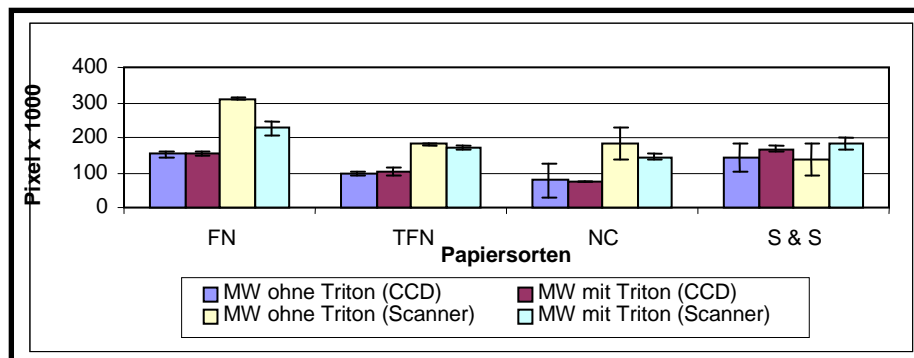


Abb.11: Silberfärbung – Bestimmung der Spot-Homogenität mit BSA-Lösung ($c = 100 \text{ ng}/\mu\text{l}$) bei einem Spotvolumenvolumen von $1,5 \text{ } \mu\text{l}$ (Auswertung: Scanner und CCD-Kamera, Programm: Phoretix Array 2.0, Messung gesamter Spot / MW = Mittelwert, FN = FN 11 Membran - Filtrak, TFN = TFN Membran - Filtrak, NC = Nitrocellulose-Membran, S&S = Schleicher & Schüll)

Für die weiteren Untersuchungen wurde die Membran FN 11 aufgrund der hohen Signale, meist akzeptablen Präzision und ihrer geringen Hintergrund-Färbung ausgewählt. Hinzu kam, dass die Membran in ausreichenden Mengen verfügbar war. Zur Auswertung der Färbungen wurde schließlich durch den geringeren Aufwand der Scanner eingesetzt.

- **optimierte Parameter**

Die Silberfärbung wurde mit entsprechender Eichung unter folgenden Parametern angewendet:

- **Membran:** Verwendung von **FN 11** (Filtrak)
- **Spot-Volumen:** **1,5 µl**
- **Aufnahmetechnik:** **Scanner**

In der Abb.12 ist eine mit diesen Parametern erstellte Eichkurve dargestellt.

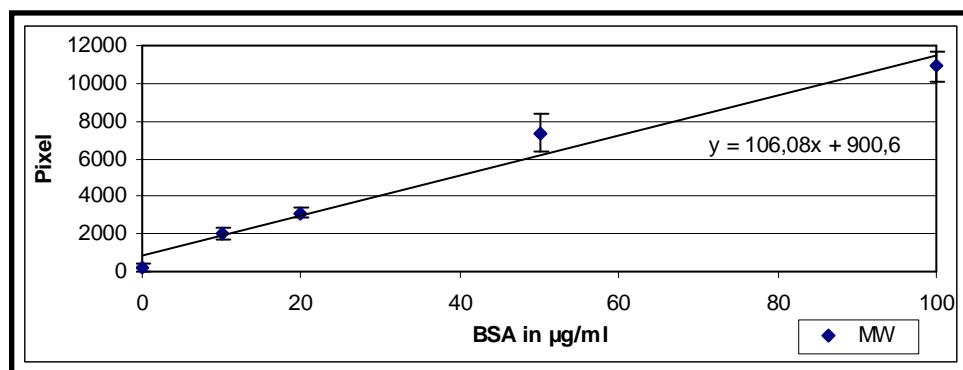


Abb.12: Silberfärbung – Eichreihe mit einer BSA-Lösung
(0-100 µg/ml in PBS-Puffer / MW aus jeweils 8 Messwerten) unter optimierten Parametern (Auswertung: Scanner, Phoretix Array 2.0)

Die Silberfärbung zeigt besonders in der Schwankungsbreite der Messwerte, in der Handhabung und dem dynamischen Bereich zur Proteinbestimmung kein zufriedenstellendes Ergebnis. Die Kompatibilität mit der „liquig handling Technik“, der geringe Probenverbrauch und die niedrigen Materialkosten waren zu dem Zeitpunkt der Arbeit jedoch ausschlaggebend für ihre Anwendung.

- **Anwendungsbeispiel – Silberfärbung**

Mit dem optimierten Verfahren erfolgte der Test auf die praktische Anwendung der Silberfärbung anhand des Beispiels „Serum 1“. Nach chromatographischer Trennung wurden für die Silberfärbung von jeder unverdünnten Fraktion ein Volumen von 1,5 µl verwendet. Die Abb. 13 zeigt ein Beispiel einer Membran nach Silberfärbung.

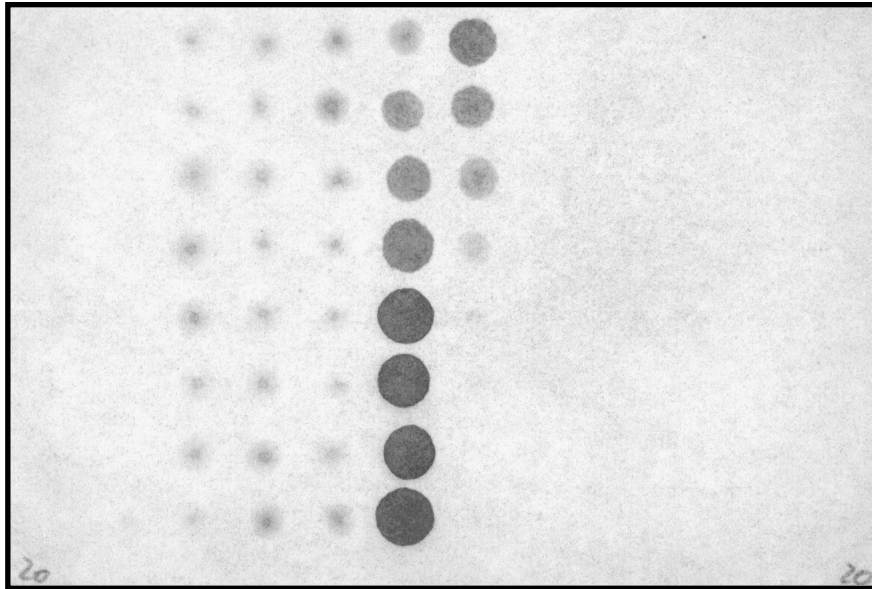


Abb.13: Silberfärbung - 20. 2D-Fraktion aller 96 1D-Fraktionen
(„Serum 1“ / Phosphatpuffer / 1,5 µl Spots / Membran FN 11 der Firma Filtrak / nach Färbung wie beschrieben / Auswertung: Scanner, Programm: Phoretix Array 2.0)

Die Analyse war in der 1. Dimension in allen Fraktionen gleichzeitig möglich. Mit dem Versuch konzentrationslineare Signale zu erhalten, wurde eine 1:10-Verdünnung der Proben untersucht. Der Abb. 14 ist zu entnehmen, dass in den Fraktionen 50-90 der unverdünnt gemessenen Proben keine quantitativen Signale vorliegen. Aufgrund der im Laufe der Arbeit gegebenen Möglichkeit, UV-Absorbanzen in Mikroplatten messen zu können, wurden diese Untersuchungen eingestellt.

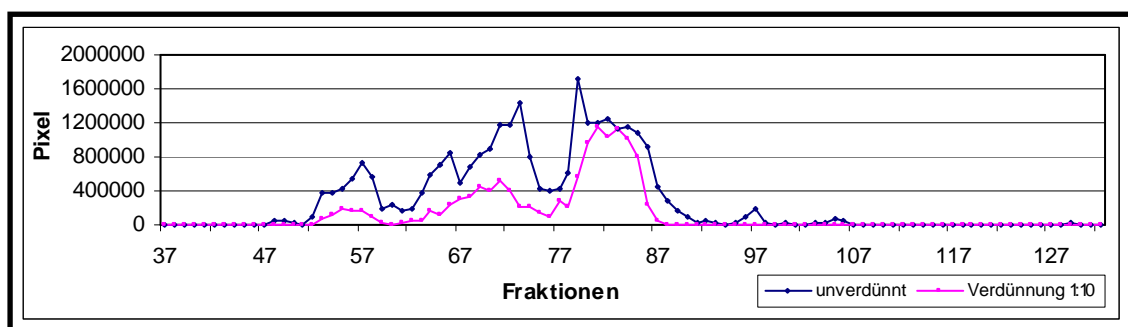


Abb.14: Silberfärbung – Anwendungsbeispiel an einer Serumentrennung mit relativer Quantifizierung
(„Serum 1“ / 1. Dimension / Phosphatpuffer / Auswertung: Scanner, Programm: Phoretix Array 2.0)

4.1.3 Proteinbestimmung durch optische Messung (OD)

Ein weiteres Verfahren zur Quantifizierung der in den fraktionierten Proben enthaltenen Proteine stellt die UV-Absorbanz-Messung dar. Diese aussichtsreiche Möglichkeit zur Erfassung der Proteinkonzentrationen großer Probenanzahl eröffnete sich im Laufe der Arbeit durch die Weiterentwicklung spektrophotometrischer Geräte und der Einführung von UV-durchlässigen Mikroplatten (UV Star® Microplates der Firma Greiner / 96 und 384 well). Ziel war es nun, die UV-Absorbanz-Messung zur Proteinbestimmung für das Proteom-Projekt zu optimieren und zu nutzen.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt dabei ohne die Zugabe eines Reagenzes mit dem Vorteil, dass die Proben weiteren Analyseverfahren erhalten bleiben. Durch die Verwendung von Mikroplatten ist die parallele Analyse von 96 bzw. 384 Proben gleichzeitig möglich.

Die Grundlage der spektrophotometrischen Quantifizierung stellt das Lambert-Beer'sche Gesetz dar:

$$A_{\lambda} = \epsilon_{\lambda} \times c \times d + A_0 \quad (1)$$

Dies bedeutet, dass die Absorbanz A bei einer definierten Wellenlänge λ abhängig ist von dem Extinktionskoeffizienten ϵ_{λ} , der Konzentration c der zu untersuchenden Substanz, der Schichtdicke d und dem Blindwert A_0 . Es galt, die nutzbaren Wellenlängen, die Auswirkungen einer unterschiedlichen Proteinzusammensetzung, die Abhängigkeit der Absorbanz von der Konzentration und Schichtdicke sowie den Einfluss störender Substanzen zu untersuchen.

- **Wahl der Wellenlänge**

Die in der Literatur angegeben Maxima zur Bestimmung der Proteinkonzentration liegen bei Wellenlängen (λ) von 205 nm und 280 nm (Stoscheck 1990). Verantwortlich für diese beiden Maxima sind die Peptidbindung (205 nm) bzw. die aromatischen Aminosäuren (280 nm). Es war zu prüfen, ob die bekannte Konzentrationsabhängigkeit der Absorbanz bei 280 nm auch bei 205 nm gilt und inwieweit derartige Messungen in Mikroplatten möglich sind.

In der Abb.15 sind Spektren verschiedener Proteine zu sehen. Die Absorbanz für die verschiedenen Proteine (BSA, humanes IgG, bovines IgG, HSA, Hämoglobin, Lysin,

Chymotrypsin) ergab bei 205 nm nahe beieinander liegende Werte, da die Absorbanz in diesem Wellenlängenbereich allein durch die Peptidbindung bestimmt wird. Der Mittelwert der Messungen betrug bei 205 nm $0,479 \pm 0,033$ und $0,0234 \pm 0,0125$ bei 280 nm.

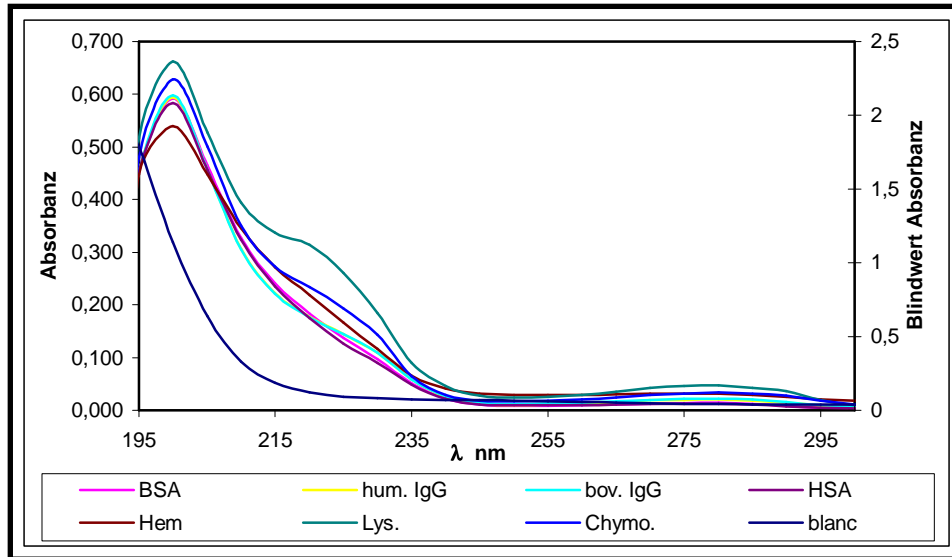


Abb.15: UV-Spektren verschiedener Proteine bei einer Konzentration von $c = 50 \mu\text{g/ml}$
(BSA = bovines Serum Albumin, hum. IgG = humanes IgG, bov. IgG = bovines IgG, HSA = humanes Serum Albumin, Häm = Hämoglobin, Lys. = Lysozym Chymo = Chymotrypsin, blanc = Blindwert / 10 mM Tris – Puffer / pH = 7.4 / 150 μl je well, / 96- er UV Star Platten von Greiner)

In der Abb. 15 ist außerdem zu erkennen, dass die Messwerte bei 205 nm um ein Vielfaches höher sind als bei 280 nm. Bei einer Wellenlänge von 280 nm werden größere Unterschiede für unterschiedliche Proteine erwartet (Abb.14). Ein Nachteil der Nutzung der Absorbanz bei 205 nm ist jedoch der hohe Blindwert in den UV Star Platten in dem Wellenlängenbereich.

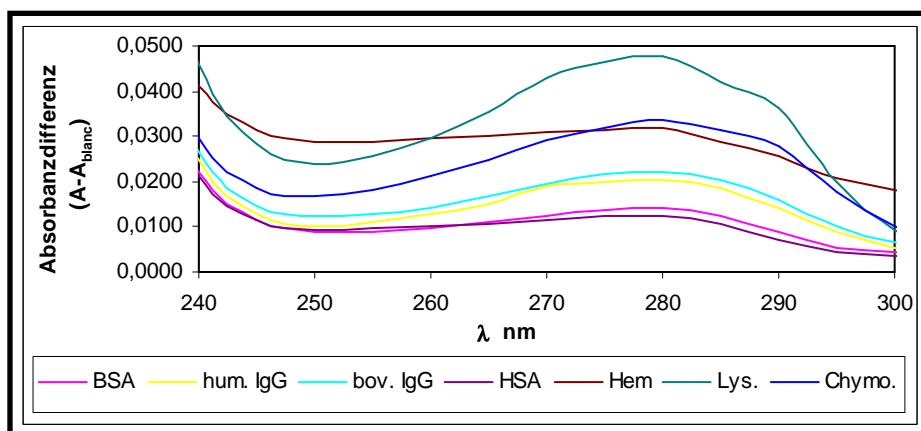


Abb.16: UV-Spektren (240-300 nm) verschiedener Proteine bei einer Konzentration von $c = 50 \mu\text{g/ml}$
(BSA = bovines Serum Albumin, hum. IgG = humanes IgG, bov. IgG = bovines IgG, HSA = humanes Serum Albumin, Häm = Hämoglobin, Lys. = Lysozym Chymo = Chymotrypsin, blanc = Blindwert / 10 mM Tris – Puffer / pH = 7.4 / 150 μl je well, / 96- er UV Star Platten von Greiner)

- **Schichtdicke bzw. Probenvolumen**

Aufgrund einer Abhängigkeit der Absorbanz (A) von der Schichtdicke (d') und dadurch bei Vertikalphotometern auch vom Volumen im well und von Meniskusausbildungen, war es notwendig das minimal mögliche Volumen in den jeweiligen Mikroplatten zu ermitteln. Die Untersuchung der Abhängigkeit der Absorbanz bei unterschiedlichen Volumina erfolgte bei einer konstanten Proteinkonzentration (BSA in unterschiedlichen Lösungsmitteln). Die Abb. 17 gibt die Abhängigkeit der Absorbanz vom Probenvolumen in den 96-er und 384-er UV Star Platten wieder.

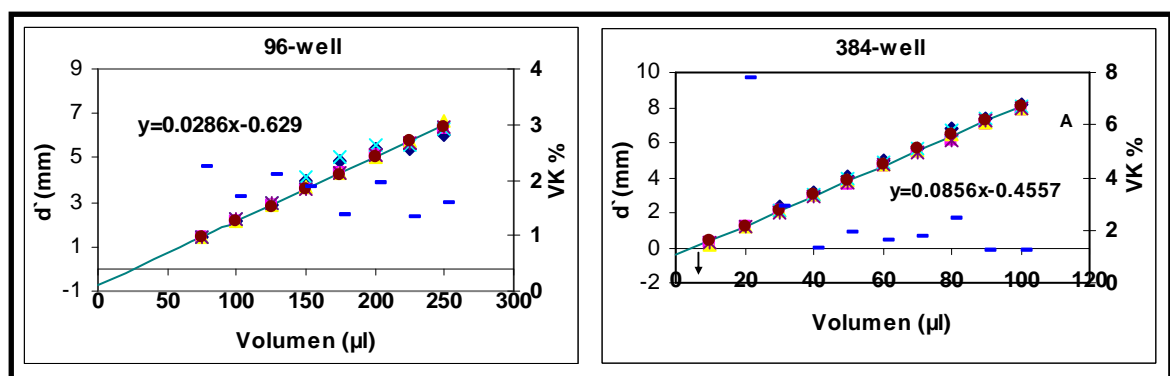


Abb.17: Abhängigkeit der Absorbanz vom Probenvolumen
(d' = volumenabhängige Lichtweglänge / VK % = Variationskoeffizient / BSA in unterschiedlichen Lösungsmitteln, $n = 8$ / Messung: SPEKTRAmx PLUS reader, 96 und 384 well UV Star Platten)

Unter Verwendung der 96-er UV Star Platten muss ein Mindestvolumen von 75 μl eingesetzt werden. Der Variationskoeffizient beträgt 1–2% bei Volumina größer als 75 μl . Werden kleinere Volumina als 60 μl verwendet, steigt der Variationskoeffizient dramatisch an und auch optisch sichtbar sind die wells nicht gleichmäßig ausgefüllt (nicht gezeigt). Das maximale Volumen, welches zur Bestimmung eingesetzt werden kann, wird durch die Mikroplatten vorgegeben und beträgt 250 μl .

Die gleichen Untersuchungen wurden mit den 384-er UV Star Platten durchgeführt. Für Volumina größer als 40 μl ergibt sich ebenfalls ein Variationskoeffizient von 1-2%. Das maximale Volumen zur Messung liegt bei 100 μl .

Stärkere Abweichungen ergaben sich bei der Verwendung oberflächenaktiver Substanzen (z.B. Triton X-100), da diese die Meniskusform beeinflussen (Daten nicht gezeigt). Allerdings können auch Proteine die Oberflächenstruktur wandeln. Weitere Angaben sind der Publikation „UV measurements in microplates suitable for high-throughput protein determination“ (Kreusch et al. 2003) zu entnehmen.

- **linearer Bereich**

Mit der UV-Absorbanz-Messung ist es möglich unter Verwendung unterschiedlicher UV-Bereiche, Proteinkonzentrationen in einem Bereich von 1-8000 µg/ml (96-er Mikrotiterplatten) zu bestimmen (Kreusch et al. 2003). Die Messung mit dem SPECTRAmax PLUS Readers erfolgt bei einer Wellenlänge von 205, 215 und 280 nm. In der Abb.18 sind die linearen Beziehungen zwischen Konzentration und Absorbanz sowie die zugehörigen Variationskoeffizienten (VK%) für verschiedene Wellenlängen dargestellt. Es wird deutlich, dass diese Proteinbestimmung im Vergleich zu anderen Methoden einen sehr großen dynamischen Bereich aufweist.

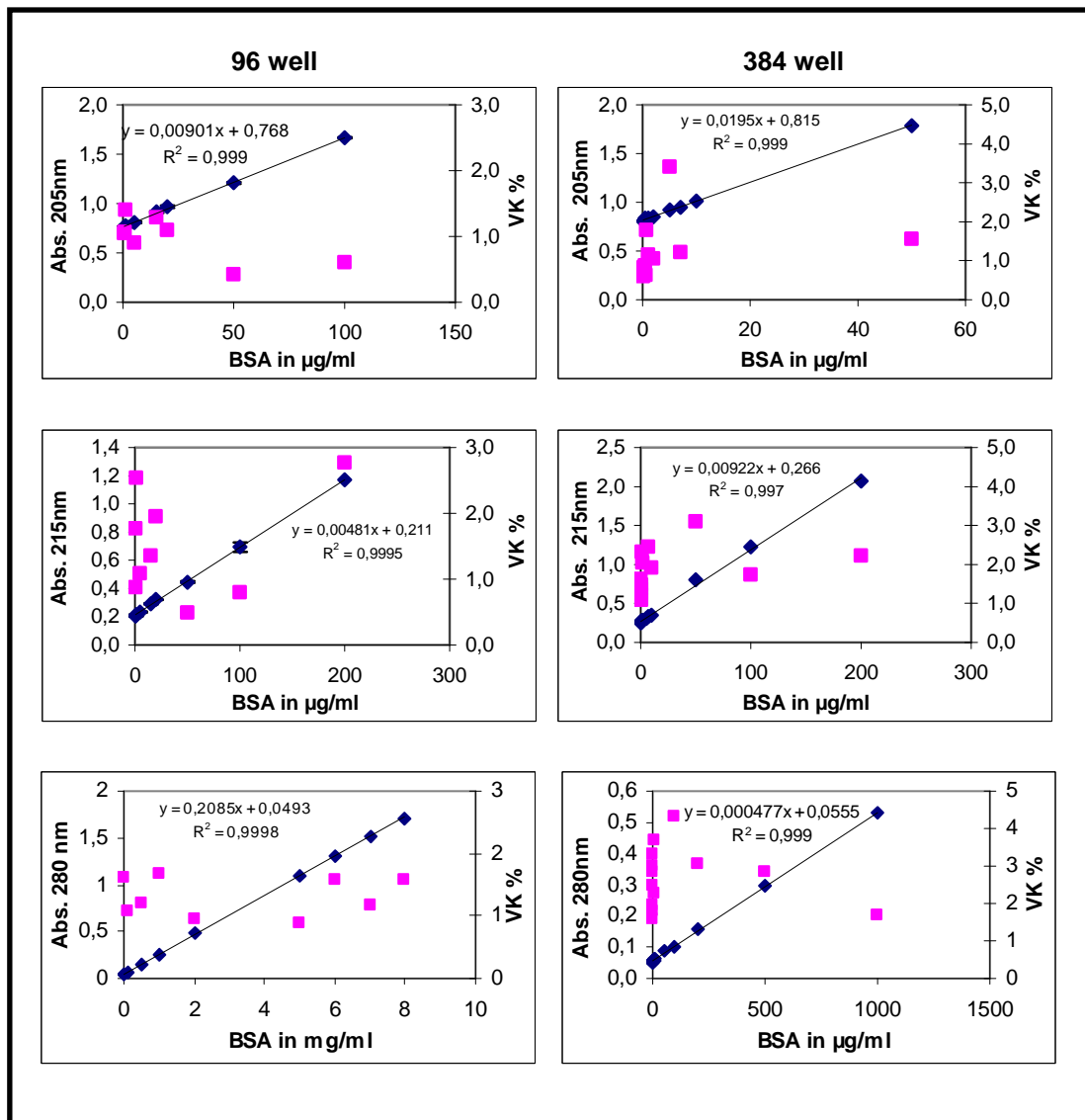


Abb.18: Konzentrationsabhängigkeit und Präzision der UV-Absorbanzen von BSA
(BSA Lösung in 10 mM Phosphatpuffer, pH = 7,4, 150 µl in 96 well bzw. 100 µl Volumen in 384 well,
♦ Absorbanz, ▪ Variationskoeffizient)

- **Störende Substanzen**

Es existieren zahlreiche niedermolekulare Substanzen wie verschiedene Puffer, Detergentien, Nukleotide, Harnsäure und Hämderivate, welche die Quantifizierung mit dieser Methode verfälschen können. Da diese Verbindungen im Serum in sehr geringen Konzentrationen vorliegen und überwiegend durch Dialyse entfernt werden können, können sie zunächst vernachlässigt werden.

- **Anwendungsbeispiel – Proteinbestimmung durch UV-Absorbanz-Messung**

Nachdem die Bedingungen für eine optimale Proteinquantifizierung durch UV-Absorbanz-Messung ermittelt wurden, erfolgte die Überprüfung der praktischen Anwendbarkeit am Beispiel einer Serumproteintrennung („Serum 5“). Die 1-D Trennung wurde wie unter 3.4.5 Materialien und Methoden aufgeführt vorgenommen. Abb.19 zeigt die ermittelten Proteinkonzentrationen nach Bestimmung der Absorbanzen bei drei UV-Wellenlängen nach Dialyse und Verwendung einer BSA-Eichreihe.

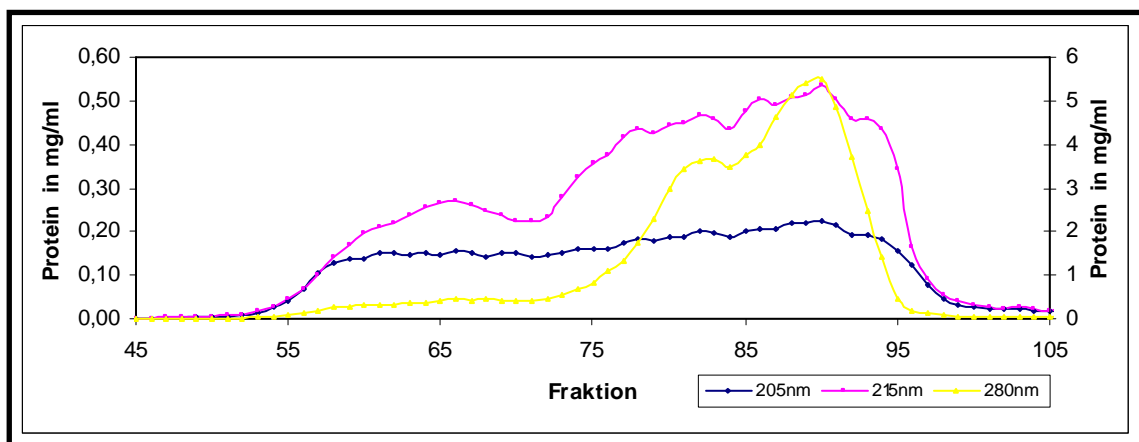


Abb.19: Proteinkonzentrationen (1. Dimension)

(„Serum 5“ / 10 mM Tris Puffer / 150 µl dialysierte Proben / 96-er UV Star Mikroplatten der Firma Greiner / SPEKTRAmx PLUS Reader)

Die Auswertung erfolgte bei einer Wellenlänge von 205, 215 und 280 nm. Parallel zu diesen Messungen wurde die Absorbanz bei $\lambda = 415, 460$ und 650 nm (Kontrollwellenlängen) bestimmt, um eine Verunreinigung der Mikroplatten, Luftblasen und Trübungen zu erfassen (nicht gezeigt). Man sieht, dass bei 205 und 215 nm kleine Proteinkonzentrationen besser aufgelöst werden können, jedoch keine Linearität mehr zur

Konzentration besteht, wenn Schwellenkonzentrationen von ca. 0,1 bzw. 0,5 mg/ml überschritten sind.

Die Anwendung der Methode für die 2. Dimension mit entsprechender graphischer Darstellung ist im Kapitel 3.5.7 (Ablauf des Trennvorganges) aufgeführt.

4.2 Ergebnisse der Dialyse

4.2.1 Basale Eigenschaften

- **Prüfung der Dialysegeschwindigkeit**

Mit 200 µl Probenvolumen wurden die Konzentrationen von p-Nitrophenol und NaCl in den Proben nach unterschiedlichen Zeitintervallen mittels Absorbanzmessung bzw. Osmolaritätsbestimmung ermittelt. In Abb. 20 ist das Ergebnis aus zwei unabhängigen Versuchen zu sehen. Es ist zu erkennen, dass unter diesen Bedingungen die NaCl-Konzentration nach 2 h auf weniger als 10% der Ausgangskonzentration gut reproduzierbar abgesunken ist.

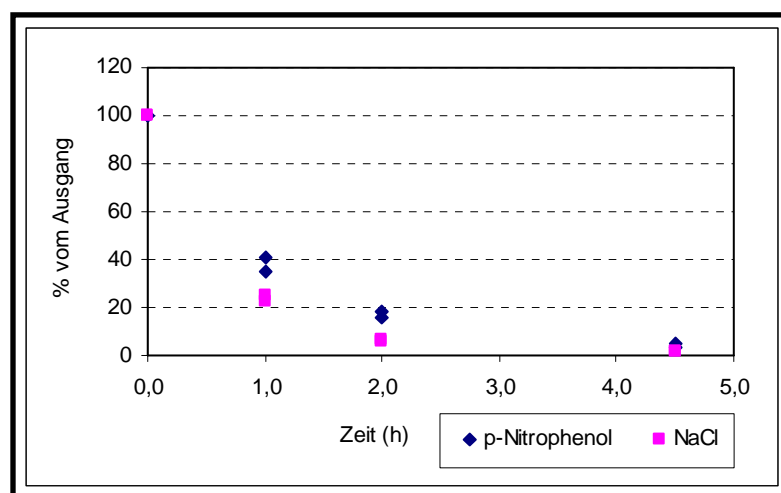


Abb.20: Restkonzentrationen von p-Nitrophenol und NaCl in 200 µl Proben nach unterschiedlichen Dialysezeiten

(200 µl Probe / 600 µM p-Nitrophenol, 150 mM NaCl / 96 well / Dialysedauer 4,5 h)

Aus jeweils 4-8 wells wurde der well-Inhalt nach den angezeigten Zeiten entnommen und die Farbstoffkonzentration bzw. die NaCl-Konzentration wie unter 3.3.4

beschrieben bestimmt. Die Streuung der Einzelwerte in jedem Versuch beträgt nach 1 und 2 h weniger als 5% VK.

- **Prüfung der Kreuzkontamination**

Da die Dialysemembran durch Klebung mit der Dialysekammer verbunden ist, kann es zu Kreuzkontaminationen der Wellinhalte durch eventuelle Undichtigkeiten kommen. Dies wurde mit Modelluntersuchungen überprüft. Dazu wurden alle wells spaltenweise alternierend mit Analyten bzw. Analyten-freiem Puffer gefüllt und 2 h dialysiert. Der Abb. 21 ist anhand der Mittelwerte für die Spalten mit p-Nitrophenol und DEP-Lösung zu entnehmen, dass nahezu kein Farbstoff in den Wells, die nur mit Puffer gefüllt waren, erscheint. Die leichte Erhöhung der Absorbanz in einzelnen Spalten mit DEP-Lösung ($0,075 \pm 0,048$ gegenüber 0,043) ist auf eine retrograde Diffusion von p-Nitrophenol aus der Außenflüssigkeit in die Wells zurückzuführen, da analoge Untersuchungen mit BSA-Lösungen keinerlei Blindwert-Erhöhung ergab (Ergebnisse nicht gezeigt). Das bedeutet, dass die Klebung dicht ist und keinerlei Kreuzkontamination stattfindet.

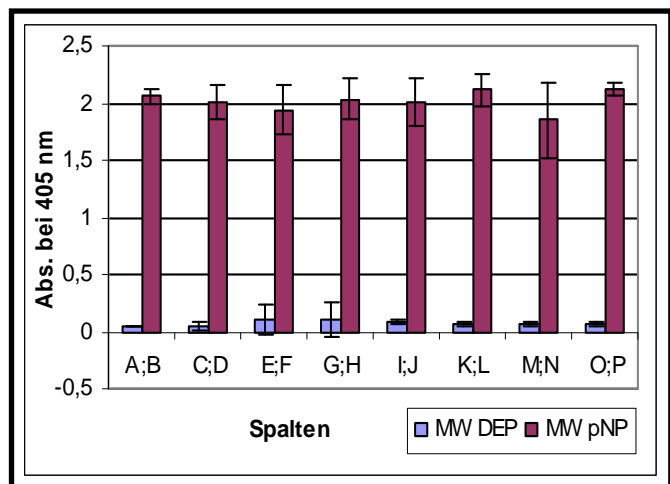


Abb.21: Dialysetest – Einfluss des Dialysevolumens von 50 bzw. 100 µl para-Nitrophenol, $c = 300 \mu\text{M}$ / gegen Aqua dest. / 60 min)

4.2.2 Dialyse von Protein-Lösungen

Um mit wertvollen Proben möglichst einen noch schnelleren Dialysiervorgang zu erzielen, wurde zunächst gegen deionisiertes Wasser dialysiert. Hier wurde jedoch eine Ausfällung der Proteine anhand der Zunahme UV-Absorbanz (nicht gezeigt) beobachtet. Die Proteinfällung ist in der Dialysekammer visuell nicht beurteilbar und nimmt zeitabhängig nach Dialyse noch zu. Deshalb wurde dieses Vorgehen aufgegeben.

Im Folgenden wurden die Proben gegen den Äquilibrierungspuffer (10 mM Tris/HCl, pH = 7,4, 25 mM NaCl) der 2. Dimension dialysiert. Dadurch konnte die Fällung der Proteine vermieden werden.

Die Dialyseeffizienz wurde unter realitätsnahen Bedingungen beim Mediumwechsel von 1D-Proben zur Vorbereitung der 2D-Trennung anhand von Osmolaritätsmessungen geprüft.

In Tabelle 7 sind die Ergebnisse zusammengefasst. Die reproduzierbar erreichten NaCl-Konzentrationen von ca. 60 mM waren ausreichend für die anschließende 2D-Trennung mittels Anionenaustauschchromatographie.

Tab. 7: NaCl-Konzentrationen in 1D-Proben nach Dialyse

(340 µl Probe von 96 1D-Fraktionen / Dialyse gegen 10 mM Tris/HCl, 25 mM NaCl, pH = 7,4 / Dialysedauer 2 h / Wechsel der Außenflüssigkeit nach 1 h)

Plattenposition	NaCl (mM)	
	n = 4	
	Mittelwert	SD
A1	59,83	3,43
H12	59,03	0,78
D1	61,57	3,75
E12	62,22	4,69

Aus Positionen, die anhand der UV-Absorbanz sehr geringe Proteinkonzentrationen aufwiesen, wurden die Inhalte entnommen und die NaCl-Konzentration mittels Osmolaritätsmessung und unter Verwendung einer NaCl-Eichreihe in 10 mM Tris/HCl, pH 7,4 ermittelt (siehe 3.3.4).

4.2.3 Wiederfindung von Proteinen in 1D-Serumfraktionen

Vor und nach Dialyse von 290 µl jeder 1D-Probe wurden in den meisten Fraktionen vergleichbare Proteinkonzentrationen gefunden (Abb. 22). Lediglich in niedermolekularen Fraktionen (>100 ml Elutionsvolumen) wird ein Verlust an Analyten deutlich. Die geringen Unterschiede im Bereich hochmolekularer Proteine, die eine Zunahme der Proteinkonzentration andeuten, sind sehr wahrscheinlich auf die Schwankungsbreite der Messung zurückzuführen.

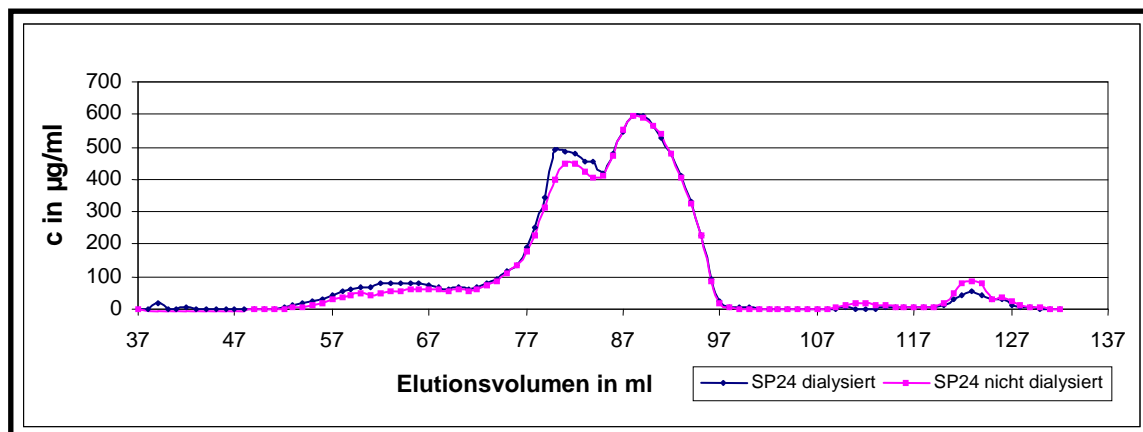


Abb. 22: Proteinkonzentration vor und nach Dialyse der 1DSerumfraktionen

(Konzentrationsbestimmung durch Absorbanzmessung bei $\lambda=280$ nm / „Serum 4“ / 10 mM Tris Puffer +25 mM NaCl/ 290 μ l je well / Dialysedauer 2 Stunden / Pufferwechsel nach 1 Stunde / Dialysekammer verschlossen mit Klebefolie / Umwälzung des Pufferbades durch Magnetrührer)

Durch die Erstellung einer entsprechenden Eichung (BSA-Eichreihe gelöst im eingesetzten Puffer) war die Bilanzierung der Proteinmengen möglich. In den gezeigten Fraktionen der Proteine und Proteinkomplexe, 57-97 ml, wurde eine Wiederfindung von durchschnittlich $110,5 \pm 18,3\%$, in den Fraktionen der Peptide im Mr-Bereich von 10-2 kDa, 98-132 ml von $39,4 \pm 23,6\%$ gefunden, was ausreichend für die weiteren Trennungen und Analysen insbesondere der Serum-Proteine erscheint.

4.3 Trennung in der 1. Dimension – Größenausschlußchromatographie

Für die 1. Dimension wurde eine HiLoadTM 16/60 – SuperdexTM 200 – prep grade Säule ausgewählt.

4.3.1 Eichung der Säule

Die notwendige Eichung der Trennsäule erfolgte mit entsprechenden Proteinen bekannten Molekulargewichtes (siehe 3.4.2 Eichung). Durch die Absorbanzmessung bei 280 nm konnte das Elutionsvolumen der einzelnen Eichproteine bestimmt werden. In Abb.23 ist eine typische Eichkurve zu sehen. Das Säulenausschlussvolumen konnte mit dem Farbstoff Dextran Blue 200 (MG = 2.000.000 Da) bestimmt werden und betrug $V = 44$ ml. Die Eichung erfolgte analog auch mit anderen Puffern (siehe 3.4.4).

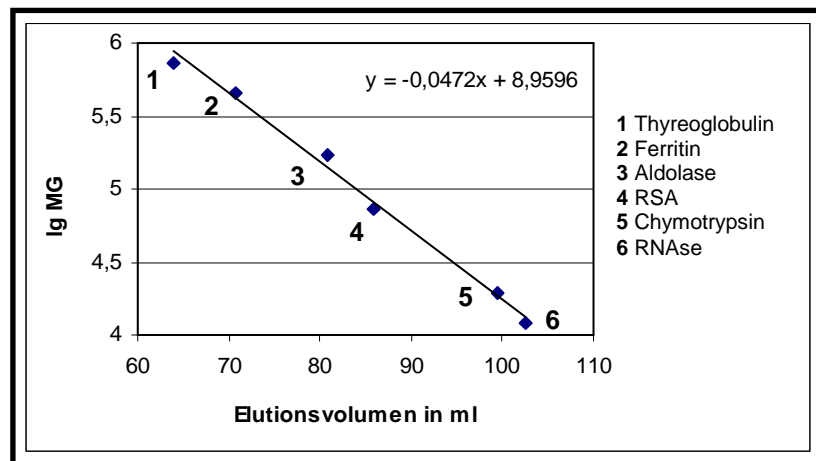


Abb.23: Eichung der Säule
(Flussrate 1 ml/min, Phosphatpuffer)

4.3.2 Native Größenausschlußchromatographie von humanem Normal-Serum

Während der experimentellen Arbeiten wurden 32 Trennungen humaner Seren verschiedener Spender mittels Größenausschlusschromatographie zum Teil mit unterschiedlichen Puffern durchgeführt. Die Abb.24 soll die Eignung der Methode in der 1. Dimension anhand von 3 Trennungen (Seren 6-8) unter Verwendung eines einheitlichen Puffers (10 mM Tris + 25 mM NaCl) veranschaulicht werden. Da es sich um Seren unterschiedlicher Spender handelte, waren geringe Unterschiede im Bezug auf die Höhe der Maximalwerte der Absorbanz (Proteingehalt) zu erwarten.

Durch eine Verringerung der Flussrate auf 0,8 ml/min konnte keine schärfere Trennleistung erzielt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Ein Einfluss der verwendeten Puffersubstanzen auf die Trennleistung kann ebenfalls vernachlässigt werden, da sich die erzielten Ergebnisse trotz unterschiedlicher Puffer (Tris, PBS) nur unerheblich verändern (Ergebnisse nicht dargestellt).

Da die Trennung nativ und nach der Größe erfolgt, sind die Proteine in wenigen Fraktionen als co-chromatographierende Proteine und komplexe Proteine enthalten. Eine weitergehende Auftrennung soll durch weitere Trennschritte erreicht werden.

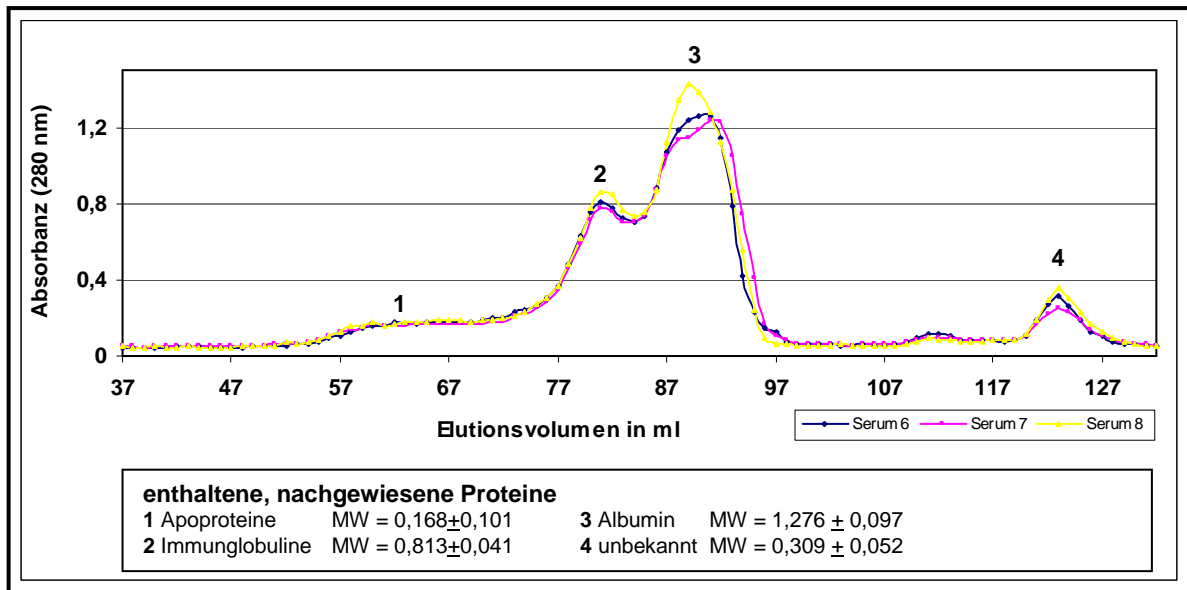


Abb.24: Chromatogramm der 1. Dimension von 3 Seren
 (angegebene Proteine aus immunologischen und massenspektrometrischen Untersuchungen innerhalb der Forschungsgruppe / 10 mM Tris Puffer / Seren unterschiedlicher Spender / Flussrate 1 ml/min / MW = Mittelwert ohne Abzug des Blindwertes)

4.4 Trennung in der 2. Dimension

Nachdem die Trennung des Proteoms in der 1. Dimension umgesetzt und die enthaltenen Proteine nach ihrer Größe in 96 Einzelfraktionen getrennt vorlagen, konnte die Trennung der 2. Dimension erprobt werden. Die Probenzahl hier und eventuell weiterer Trennschritte erfordert weitgehend parallele Trenn- und Analysemethoden. Ziel war es, ein paralleles chromatographisches Verfahren mit Minisäulen unter standardisierten Bedingungen zu entwickeln.

Dazu wurde eine neu entwickelte Vorrichtung „Polychromatograph“ oder kurz „PCG“ verwendet (siehe 3.5.2, Abb.6). Zunächst mussten die Praktikabilität und Reproduzierbarkeit der Trennung mittel PCG geprüft werden.

4.4.1 Test des Polychromatographen (PCG)

In dieser Arbeit soll auf die Modell-Untersuchungen des Elutionsverhaltens und der Kreuzkontamination am Polychromatographen unter Verwendung von Farbstoffen eingegangen werden.

- **Elutionsverhalten verschiedener Farbstoffe**

Die Tabelle 8 gibt eine Übersicht der Ergebnisse mit den verschiedenen Farbstoffen wieder.

Tab.8: Übersicht zu den Elutionsparametern und -charakteristika der Farbstoffe

Farbstoff	CuSO ₄	Methylenblau	Bromthymolblau	Alizarin Rot	Alizarin Gelb
Proben-volumen	100 µl	20 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Konzentrat-ion /Medium	1 M DEA Konz	0,03% in 3M Natriumacetat	22 mg in 10 ml Aqua dest.	10 mg in 20 ml Aqua dest.	10 mg in 20 ml Aqua dest.
Elution / verwendete Puffer	6 x 200 µl 10 mM Tris-Puffer pH = 7,5	14 x 200µl 10 mM Tris-Puffer pH = 7,5	14 x 200 µl 10 mM Tris-Puffer + 40% Propanol	14 x 200 µl 10 mM Tris-Puffer + 40% Propanol	14 x 200 µl 10 mM Tris-Puffer + 40% Propanol
Elutions-verhalten des Farbstoffes	klar abgegrenzte Bande, schnelle Elution, deutlicher Gipfel	nach Einlaufen ist klar abgegrenzte Bande zu erkennen/ erst schnelle Elution, dann schleppt sich Farbstoff mehrere Elutionen mit / Gipfel steigt steil an, fällt aber nur langsam wieder ab	schwache Elution mit breiter Bande bei Puffer mit Salzen / rasche Elution mit klarer Bande und deutlichem Gipfel bei Zugabe von 40% Propanol	keine Elution bei Salzpuffern, Elution mit 40% Propanol →Farbstoff wird langsam von der Säule gewaschen (keine klare Bande / diffuse Verteilung auf der ganzen Säule)	keine Elution bei Salzpuffern, Elution mit 40% Propanol →Farbstoff wird schnell eluiert, deutliche Bande und Gipfel zu erkennen
Wellenlänge der Messung	620 nm	620 nm	550 nm	550 nm	340 nm

- **Elutionsverhalten**

Das Elutionsverhalten wurde zunächst mit verschiedenen Farbstoffen (siehe 3.5.6) getestet. Größere Bedeutung kam Methylenblau zu, da es auch mit dem Auge in dem durchsichtigen Plexiglas des PCG gut wahrnehmbar ist. Parallel wurden die Versuche mit Kupfersulfat als Farblösung durchgeführt. Im Gegensatz zum Methylenblau ist bei der Verwendung von Kupfersulfat keine unspezifische Bindung (hydrophobe Wechselwirkung) zu beobachten, da die enthaltenen positiv geladenen Kupferionen nicht mit der Matrix reagieren (Ergebnisse Kupfersulfat-Lösung nicht gezeigt). Der negative Effekt einer Wechselwirkung zwischen Farbstoff und Matrix kann durch einen ausreichend starken Ionengradienten und eine entsprechenden Elutionsdauer aufgehoben werden. Methylenblau

verursacht im Gegensatz zum Kupfersulfat eine Färbung der Fritten (Abb. 7, Skizze des Polychromatographen). Diese kann später zu einer Verunreinigung der aufgetragenen Proben führen. Die anderen in Materialien und Methoden aufgeführten Farbstoffe kamen innerhalb der Forschungsgruppe zum Einsatz.

Die Abb.25 zeigt das Elutionsverhalten mit Methylblau am Beispiel der Reihe C / Spalte 1-12 auf. Die verzögerte Elution (Tailing) ist vermutlich auf die zusätzliche Bindung des Farbstoffes an die Matrix oder Plastmaterialien zurückzuführen. Unter Verwendung der Kupfersulfatlösung lag das Maximum der Absorbanz bereits bei 1000 µl wieder im Bereich der Norm (Daten nicht

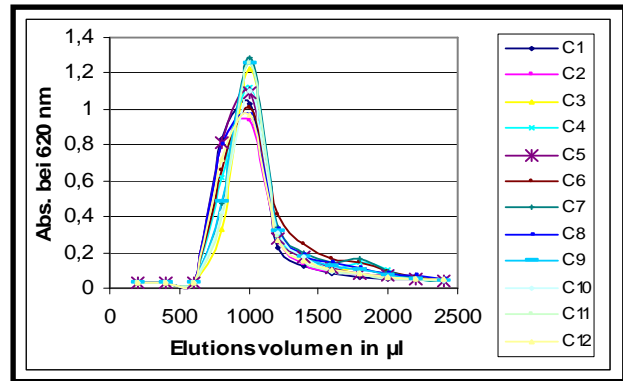


Abb.25: Elutionsverhalten mit Methylblau
(0,03% / 20 µl / Eluent: 10 mM Tris Puffer + 150 mM NaCl, je 200 µl / Messung: je 150 µl, SLT Reader)

gezeigt). Mit diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Elution von verschiedenen chemischen Verbindungen mit und ohne Wechselwirkungen mit dem Säulenmaterial jedoch einigermaßen reproduzierbar erfolgt.

- **Reproduzierbarkeit**

Da eine reproduzierbare Elution auch bei gravitationsgetriebenen Fluss für die Vergleichbarkeit von Serumentrennungen gewährleistet werden muss, galt es dies in Vorversuchen zu kontrollieren. Aus diesem Grund wurden 3 Probenplatten á 96 Einzelfraktionen (10 mM Tris, 150 mM NaCl) mit einem Auftragsvolumen von 200 µl über den Polychromatographen eluiert. Im Anschluss wurden den Eluaten 10 µl Methylblau (0,03%) hinzugegeben. Für die Bestimmung der Absorbanz ($\lambda = 620 \text{ nm}$) wurden dem Eluat-Farbstoff-Gemisch 100 µl entnommen.

Variiert das Elutionsvolumen, so erhöht oder verringert sich die Konzentration des Farbstoffes mit entsprechender Veränderung der Absorbanz. Der Mittelwert für die 3 Probenplatten betrug $MW_{OD1} = 0,657$ / $MW_{OD2} = 0,652$ / $MW_{OD3} = 0,657$ bei einer durchschnittlichen Standardabweichung von 0,017 und einem Variationskoeffizienten von 2,62 %. Das Elutionsvolumen, das durch unvollständiges Durchlaufen, Adsorption etc. variieren kann ist ausreichend gut reproduzierbar. Die Abb. 26 zeigt beispielhaft die

entsprechenden Messwerte (Reihe A-H und Spalte 1-12, Probenvolumen 100 μ l) für eine eluierte Platte.

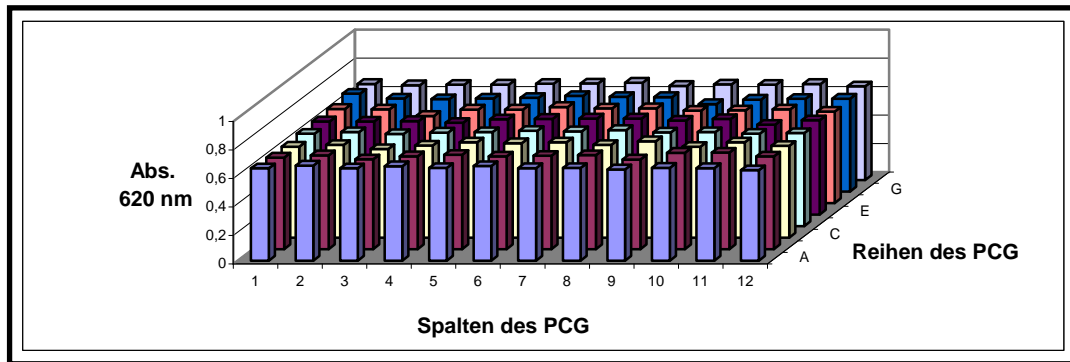


Abb.26: Elutionstest

(Platte 1 / Eluent: 10 mM Tris und 150 mM NaCl, 200 μ l / Zugabe von 20 ml Methylenblau – 0,03 % / 100 μ l Probe für SLT Reader)

- **Kontrolle der Kreuzkontamination des Polychromatographen**

Da der Polychromatograph aus zwei getrennten Teilen, dem Kopfteil und dem eigentlichen Block besteht (siehe 3.5.2 / Abb. 4), musste zwischen Kopfteil und Block ein Übertritt der Probe auf benachbarte Säulen ausgeschlossen werden. Der Übertritt der Probe soll im weiteren Verlauf als Kreuzkontamination bezeichnet werden. Um diese zu verhindern sind Kopfteil und Block fest miteinander verschraubt und verfügen über eine zusätzliche Dichtung (siehe 3.5.2). Die Kontrolle der Kreuzkontamination erfolgte nach dem in der Abb. 27 veranschaulichten Raster der Probenverteilung.

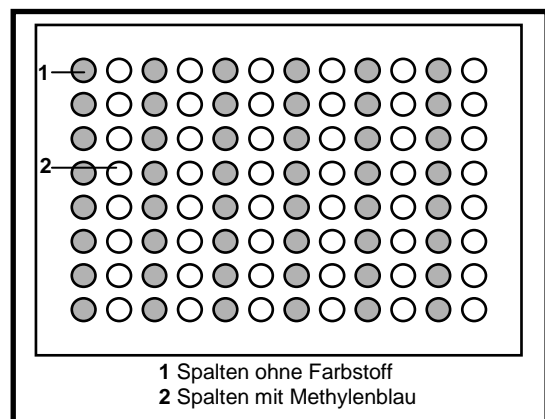


Abb.27: Raster der Probenverteilung

(20 μ l Probe Methylenblau bzw. Puffer / 200 μ l Elutionsvolumen)

Die ermittelten Messwerte (Absorbanz bei $\lambda = 620$ nm) sind der Abb. 28 zu entnehmen. In den ersten Fraktionen wurde bedingt durch das Totvolumen der Säulen keine Zunahme der Absorbanz beobachtet. Der starke Anstieg der Absorbanzen wird durch die einsetzende Elution des Farbstoffes hervorgerufen. Der sich anschließende langsame Abfall der Absorbanz ist auf die hydrophobe Wechselwirkung zwischen der Farblösung und dem Säulenmaterial zurückzuführen. Eine Kreuzkontamination zwischen den Spalten

konnte ausgeschlossen werden, da es nicht zum Ansteigen der Absorbanz in den Positionen ohne Farbstoff kam. Die prozentuale Standardabweichung bezogen auf den Mittelwert der Absorbanzmessung betrug im Fall des Puffers 0,003 % und 0,043 % für die Spalten mit Methylblau. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass nirgendwo ein Übertritt von Farblösung in benachbarte Säulchen stattgefunden hat.

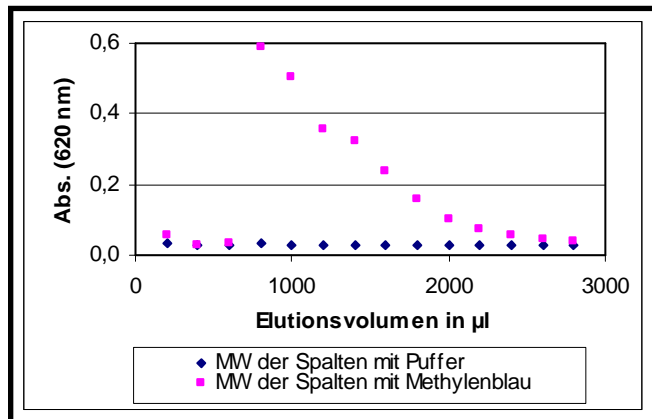


Abb.28: Test auf Kreuzkontamination
(Eluent: 10 mM Tris Puffer mit 150 mM NaCl / Elutionsvolumen pro Fraktion 200 µl)

4.4.2 Serumentrennung - 2. Dimension

Die in der 1. Trenn-Dimension gewonnenen Fraktionen wurden nach der Dialyse (siehe 3.3.4 Dialyse) in der 2. Dimension mit dem Polychromatographen nach ihrer Ladung getrennt. Aus jeder Fraktion der 1. Dimension können 25-39 2D-Fraktionen hervorgehen, welche im Anschluss auf ihren Proteingehalt untersucht werden müssen. Die variierende Anzahl der Fraktionen in der 2. Dimension ergibt sich aus der erprobenden Anwendung von unterschiedlichen Elutionsverfahren.

- **Proteinbestimmung mittels Silberfärbung in den Fraktionen der 2. Dimension**

Für die 2. Trennung wurden 150 µl der dialysierten 1D-Serumproteinfraktionen eingesetzt. Die Fraktionierung erfolgte bei einem Auftragsvolumen von je 200 µl in 39 Mikroplatten (siehe 3.5.7). Die genauen Angaben zum NaCl-Gradienten der Eluenten sind der Tabelle 9 zu entnehmen. Die Proben wurden im Anschluss bei 4°C gelagert. Die Ergebnisse der 2. Dimension mit anschließender Proteinquantifizierung mittels Silberfärbung sollen anhand des Beispiels „Serum 1“ gezeigt werden.

Tabelle 9: Elutionsschema für „Serum 1“ in der 2. Dimension

Puffer	Fraktionen	NaCl - Zusatz	Elutionsvolumen
10 mM Tris	1-3	25 mM	200 µl
	4-6	50 mM	200 µl
	7-9	75 mM	200 µl
	10-12	100 mM	200 µl
	13-15	125 mM	200 µl
	16-18	150 mM	200 µl
	19-21	175 mM	200 µl
	22-24	200 mM	200 µl
	25-27	250 mM	200 µl
	28-34	300 mM	200 µl
	35-39	400 mM	200 µl

Die Abb.29 zeigt das Elutionsprofil beispielhaft für 8 1D-Fraktionen nach Silberfärbung. Die Auftrennung der enthaltenen Proteine ist anhand der unterschiedlichen Pixelwerte (siehe 3.2.2) deutlich zu erkennen.

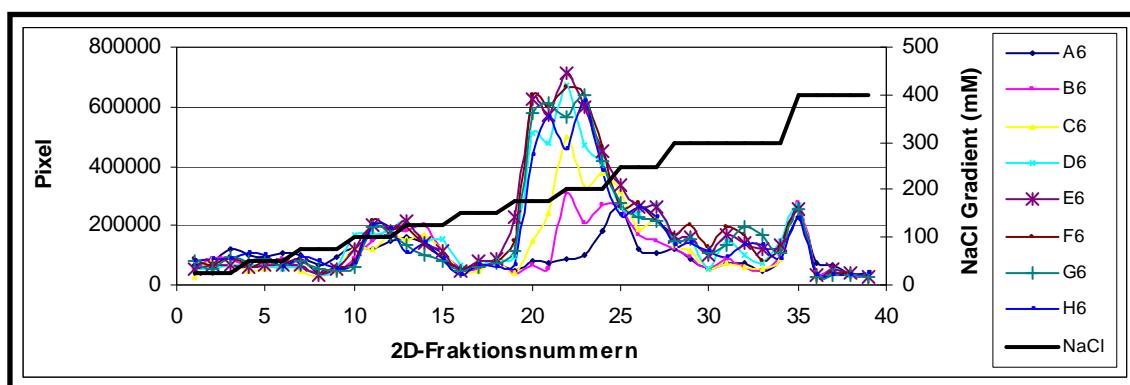


Abb.29: Beispiel für die Serumentrennung in der 2. Dimension (Polychromatograph)
(„Serum 1“ Spalte 6 Reihe A-H / Silberfärbung / Auswertung: Scanner / Programm: Phoretix Array 2.0 / 10 mM Tris Puffer mit einem NaCl-Gradienten)

Die gewonnen Daten der 1. Dimension (x-Achse) und der 2. Dimension (y-Achse) mit ihren zugehörigen Pixelwerten (z-Achse) sind zu einem dreidimensionalen Bild in der Abb. 30 zusammengefügt.

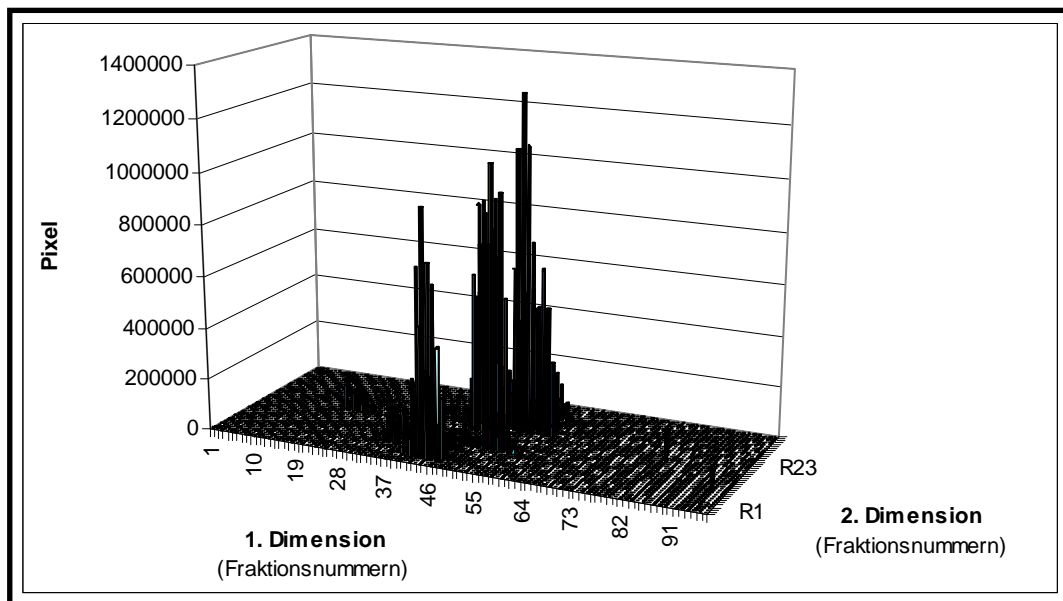


Abb. 30: 3-D Darstellung einer Serumtrennung in der 2. Dimension nach Silberfärbung
(„Serum 1“/ Auswertung: Scanner / Programm: Phoretix Array 2.0 / 10 mM Tris Puffer mit einem NaCl-Gradienten)

Die farbliche Codierung der Proteinkonzentrationen einer 2-dimensionalen Darstellung (entsprechende Farblegende mit zugehörigen Konzentrationen) erwies sich als übersichtlichere Möglichkeit zur Veranschaulichung der Ergebnisse nach erfolgter Trennung und Quantifizierung. Die Umsetzung in Form einer solchen Grafik soll am Beispiel „Serum 3“ nach Ermittlung der Proteinkonzentration durch die Bestimmung der Absorbanz erfolgen (siehe Abb. 31, Seite 56).

- **Proteinbestimmung mittels UV-Absorbanz-Messung in den Fraktionen der 2. Dimension**

500 µl der 96 Fraktionen der 1. Dimension des „Serum 3“ wurden nach Dialyse je Säule aufgebracht und mit einem 10 mM Tris Puffer (pH = 7,4) unter den in Tabelle 10 angegebenen Zusätzen stufenweise eluiert.

Tabelle 10: Elutionsschema für „Serum 3“ in der 2. Dimension

Puffer	Fraktionen	NaCl Zusatz	Elutionsvolumen
10 mM Tris	1-3	25 mM	200 µl
	4-6	50 mM	200 µl
	7-9	100 mM	200 µl
	10-12	150 mM	200 µl
	11-13	300 mM	200 µl
	14-16	500 mM + 10% Propanol	200 µl
	17-22	500 mM + 20% Propanol	200 µl

Die Quantifizierung erfolgte durch Absorbanz-Messung bei 280 nm (siehe 3.2.2). Die Ergebnisse wurde in einer 2- dimensionalen farbcodierten Graphik zusammengefasst (Abb.31).

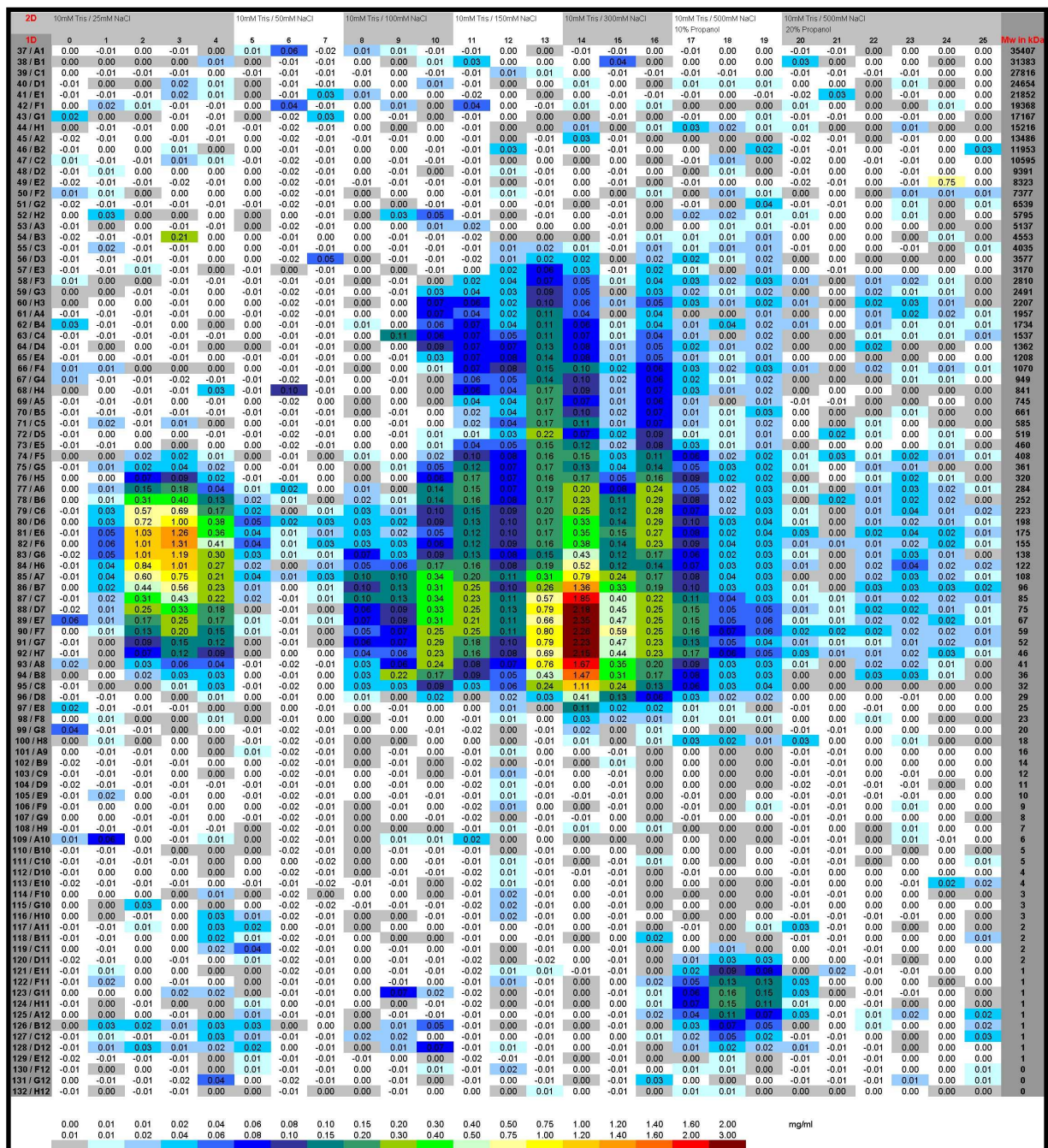


Abb.31: Proteinpuster eines humanen Serums nach einer 2-dimensionalen Trennung
(am Beispiel „Serum 3“ / Proteinkonzentrationsbestimmung durch Messung der Absorbanz bei 280 nm / 10 mM Tris Puffer mit NaCl-Gradienten)

5. Diskussion

Ziel der Arbeit waren Vorversuche zur mehrdimensionalen, chromatographischen und nativen Trennung eines Modell-Proteoms. Von den 3 genannten Aufgabenstellungen galt der besondere Schwerpunkt der Suche nach geeigneten Proteinbestimmungsmethoden, da diese gegenwärtig den schwächsten Punkt in der Proteomforschung darstellen. Das geeignetste Verfahren sollte nach seiner Empfindlichkeit, Linearität, eingesetzten Probenvolumen, Zeitbedarf, Kosten, störende Substanzen und Präzision beurteilt werden. Ein Hauptteil der Untersuchung lag in der Anwendbarkeit ausgewählter Methoden im Bezug auf Praktikabilität und Handling bei einem großen dynamischen Bereich sowie hoher Probenanzahl. Die anschließende Identifikation der enthaltenen Proteine erfolgte durch immunologische und massenspektrometrischen Untersuchungen innerhalb der Gruppe. Die gewonnenen Analysedaten sollten zu einem anschaulichen 2-dimensionalen Abbild des Proteoms zusammengefügt werden.

5.1 Das Modell-Proteom „humanes Serum“

„Humanes Serum“ ist besonders attraktiv, weil dieses Proteom eine hohe Praxisrelevanz aufweist, leicht zu gewinnen ist und zahlreiche potentielle Bio-Marker enthalten kann.

Die Relevanz des humanen Serums als diagnostische Mittel wird in der Literatur immer wieder hervorgehoben (Anderson und Anderson 2002, Tirumalai et al. 2003, Adkins et al. 2002, Pieper et al. 2003). Die große individuelle Variabilität wird durch die Vielzahl an möglichen Zuständen des Proteoms zu unterschiedlichen Zeitpunkten erheblich erweitert. Proteome sind allgemein im Gegensatz zu Genomen durch eine Dynamik in Abhängigkeit sowohl vom Genom, als auch der Umwelt und der „Zell-Vorgeschichte“ gekennzeichnet (Huber 2003, Adkins et al. 2002). Durch die Charakterisierung der Gesamtheit aller Proteine des humanen Serums als dynamisches Proteom bzw. als Indikator (Erfassung von Bio-Markern), erhofft man sich eine wesentlich stärkere Aussagekraft über den Gesundheitszustand eines Individuums zu erlangen als mit der bisher üblichen Bestimmung einzelner Parameter (Anderson und Anderson 2002, Tirumalai et al. 2003).

Die im Plasma enthaltenen Proteine lassen sich in 2 Gruppen unterteilen, die „klassischen“ Proteine, die ihre Funktion im Plasma ausüben und die Proteine, deren Funktion nicht im Plasma erfolgt (Jacobs et al. 2005). Den Hauptanteil bilden dabei die „klassischen“ Proteine,

zu welchen das Albumin und die Immunglobuline gehören (Pieper et al. 2003). Beide Gruppen sind durch Proteininteraktionen untereinander gekennzeichnet.

Die Gesamtkonzentration der im humanen Serum enthaltenen Proteine beträgt ca. 60-80 mg/ml. Die Anzahl verschiedener molekularer Formen lässt sich auf mehr als 10.000 schätzen (Anderson und Anderson 2002, Adkins et al. 2002). Anderson und seine Mitarbeiter gehen noch einen Schritt weiter und sprechen von ca. 500.000 Proteinen im Plasma, welche durch verschiedenste Modifikationen entstehen (Anderson und Anderson 2002).

Kennzeichnend für das Plasma bzw. Serum ist ein großer dynamischer Konzentrationbereich, wodurch die Quantifizierung einzelner Proteom-Bestandteile erschwert wird. Nur wenige Proteine wie z.B. das Albumin (35-50 mg/ml) liegen in einer sehr hohen Konzentration vor. Die Mehrzahl der Proteine befinden sich im ng- und pg-Bereich (z.B. Interleukine 6 mit 0-5 pg/ml) (Adkins et al. 2002). Klar wird von R.S. Tirumalai die besondere Bedeutung der Proteine mit geringem Molekulargewicht herausgestellt wie z.B. Bio-Marker in Form von Tumor-Markern, physiologisch wichtige Proteine wie Cytokine, Hormone und proteolytische Peptidfragmente (Tirumalai et al. 2003). Speziell die Bio-Marker gehören zu den weniger charakterisierten Proteinen, da sie nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegen (Jacobs et al. 2005). Die Voraussetzung für die Identifizierung der Bio-Marker bildet nach Shen et al. die Optimierung der Trenntechnik bei gleichzeitiger Minimierung der Trennschritte. Er eliminierte das Albumin und die Immunglobuline über eine Affinitätschromatographie, um so die Proteine geringerer Konzentrationen identifizieren zu können (Shen et al. 2005).

Als besonders günstig erweist sich die Einfachheit, mit welcher humanes Serum gewonnen werden kann. Die Untersuchung z.B. anhand von Cerebrospinalflüssigkeit oder Synovialpunktaten erfordert ein invasives Vorgehen mit erheblichem Mehraufwand unter Schmerzen und Risiken. Die Verwendung einer Urinprobe für diese analytischen Zwecke wäre ebenfalls mit einem erhöhten Aufwand verbunden, da diese zentrifugiert und konzentriert werden müsste. Eine Gefahr bestünde außerdem in einer möglichen bakteriellen Kontamination der Probe (Anderson und Anderson 2002).

5.2 Beurteilung der Quantifizierungsmöglichkeiten

Gegenwärtig werden in der Proteomforschung physikalische und chemische Methoden zur Proteinquantifizierung eingesetzt. Die physikalischen Methoden wie z.B. die UV-Absorbanz-Messung werden meistens nach chromatographischen Trennungen eingesetzt. Die chemischen Methoden in Form von Färbungen mit Silber- oder Fluoreszenzlösungen etc. finden ihre Anwendung nach einer 2-D-Gel-Elektrophorese (Westermeier und Marouga 2005).

Die Quantifizierung konzentrierte sich zu Beginn der Arbeit auf Standardmethoden mit ihrer Anwendung im Mikroplattenformat. Bei der relativ geringen Probenzahl in der 1. Dimension (96) kamen u.a. die Methode nach Bradford und die Biuret-Reaktion zum Einsatz. Diese sind für diese Zwecke prinzipiell anwendbar. Für die 2. Dimension gelangte man jedoch aufgrund der geringen Sensitivität, des hohen Zeitbedarfs (Inkubation, Verdünnungsreihen) und des geringen linearen Bereiches an Grenzen (siehe Tab.5: Übersicht der Proteinbestimmungsmethoden). Hinzu kommt die Abhängigkeit der Farbkomplexbildung von der Proteinzusammensetzung. Außerdem muss die Messung meist innerhalb eines definierten Zeitraumes nach der Zugabe der Farblösung erfolgen, um eine mögliche Präzipitation und eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden (Kreusch et al. 2003), was bei hoher Probenzahl immer schlechter gelingt.

Bei allen Standardmethoden sind mehr oder weniger aufwendige Pipettierschritte notwendig, wobei ein großer Probenanteil benötigt wird. In jedem Fall geht ein Teil der Probe unwiederbringlich verloren und steht für die nachfolgende Analyse nicht mehr zur Verfügung.

Mit den experimentellen Untersuchungen einer 2. Trenntechnik erfolgte gleichzeitig die Suche nach einem geeigneten Quantifizierungsverfahren für die enthaltenen Proteine.

Zu Beginn wurde die Silberfärbung von Proteinspots aufgrund ihrer hohen Sensitivität (im μg -Bereich) in Erwägung gezogen, da es sich bei dieser Methode um ein etabliertes Verfahren handelt. Prinzipiell ist dies mit Einschränkungen auch möglich (siehe 4.1.2). Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen ist mit geringer Probenmenge ($1,5 \mu\text{l}$) möglich, jedoch handelt es sich bei der Silberfärbung, um eine recht aufwändige Methode (ca. 30 Membranen pro 2-dimensionaler chromatographische Trennung). Der sehr hohe Zeitbedarf durch die Verdünnungen, die verschiedenen Schritte zur Fixierung, Waschung, Färbung und Trocknung. Einschränkungen ergeben sich außerdem in der Praktikabilität, da die verwendeten Membranen in ihrer Bearbeitung sehr empfindlich sind (u.a. Zerreißen der Membranen beim Waschvorgang). Die Silberfärbung zeigt besonders in der

Schwankungsbreite der Messwerte, in der Handhabung und dem dynamischen Bereich zur Proteinbestimmung kein voll zufrieden stellendes Ergebnis. Die Kompatibilität mit der „liquid handling Technik“, der geringe Probenverbrauch und die niedrigen Materialkosten waren zu dem Zeitpunkt der Arbeit ausschlaggebend für ihre Anwendung.

Mit der Möglichkeit einer Quantifizierung der Proteinmengen in den Fraktionen durch die Bestimmung der UV-Absorbanz konnten viele Nachteile der colorimetrischen Verfahren überwunden werden. Die Bestimmung der UV-Absorbanzen stellt im Moment das Mittel der Wahl dar, um die in der 1. und 2. Dimension enthaltenen Proteinmengen zu erfassen. Nach den Ergebnissen ist eine Linearität der UV-Absorbanz im Bereich von 1-8000 µg Protein/ml mit Variationskoeffizienten von weniger als 3% (96 well) und weniger als 4,5% (384 well) bei 205, 215 und 280 nm gegeben. Anhand von Spektren verschiedener Proteine konnte nachgewiesen werden, dass die proteinabhängigen Unterschiede in der Absorbanz bei einer Wellenlänge von 205 nm geringer sind als bei einer Wellenlänge von 280 nm (Sapan et al. 1999). Dies ist durch die alleinige Abhängigkeit der Absorbanz von der Peptidbindung bei 205 nm zu erklären. Aus diesem Grund besitzen Proteine bei einer Wellenlänge von 205 nm annähernd gleiche Extinktionskoeffizienten (ϵ), welche eine Eichung für jede durchgeführte Messung unnötig machen. Die Messung kann ohne die Zugabe eines Reagenzes erfolgen, so dass eine Inkubationszeit entfällt und die Proben weiteren analytischen Verfahren zur Verfügung stehen. Es bleibt festzustellen, dass durch die Messung der UV-Absorbanz bei 280 nm ein großer dynamischer Bereich erzielt werden kann. Allerdings sind sehr geringe Konzentrationen mit geringerer Sensitivität messbar. Wellenlängen < 280 nm weisen eine höhere Empfindlichkeit auf, mit dem Nachteil im Bereich großer Konzentrationen nicht mehr die erforderliche Linearität zwischen Absorbanz und Konzentration zu erfüllen. Aufgrund dieser Ergebnisse sollte je nach zu erwartender Konzentration die entsprechende Wellenlänge bevorzugt werden oder aber eine Kombination beider Messbereiche geprüft werden.

Zur Quantifizierung ist ein Mindestvolumen von 75 µl bzw. 30 µl notwendig (96 bzw. 384 well). Da die Proben im Anschluss unverändert zur Verfügung stehen, stellt die Bereitstellung einer ausreichenden Probe zur Vermeidung von Ungenauigkeiten kein größeres Problem dar. Bedeutender ist die Wirkung oberflächenaktiver Substanzen im Bezug auf die Meniskusbildung. Durch die Überprüfung des Blindwertes ist die Beeinflussung der Messung zu kontrollieren und störende Substanzen (z.B. Pufferbestandteile, Detergentien) sind gegebenenfalls zu eliminieren bzw. gesondert zu erfassen (Sapan et al. 1999).

Zusammenfassend kann die Proteinbestimmung unter Nutzung der UV-Absorbanz als eine sehr schnelle, effektive und kostengünstige Methode zur Quantifizierung über einen großen dynamischen Bereich betrachtet werden. Die parallele Messung der Absorbanz ohne Zugabe eines Farbreagenzes mit der Option auf weitere Analysemöglichkeiten wird gegenwärtig als praktikable Lösung gesehen.

Die auf diese Weise in der 1. und 2. Dimension gewonnen Daten (Trennung, Quantifizierung) konnten zu einem charakteristischem Proteinmuster zusammengefügt werden. Die 3-dimensionale Darstellung erwies sich aufgrund einer Hauptgipfeldominanz als nicht vorteilhaft, so dass eine 2-dimensionale farbcodierte Graphik bevorzugt wurde (siehe Abb.32: Proteinmuster eines humanen Serums nach einer 2-dimensionalen Trennung).

5.3 Weiterentwicklung der Dialysekammer

Um optimale Kompatibilität der Trennschritte zu gewährleisten, wurde an einem Verfahren zur parallelisierten Dialyse gearbeitet. Durch Dialyse können die Proben von störenden Detergentien (z.B. Triton X-100), Ionen etc. befreit werden. Zu Beginn der Arbeit existierte dafür keine kommerzielle Lösung.

Aufgrund der Notwendigkeit definierter Ionenverhältnisse im Puffer zur Größenausschlußchromatographie der 1. Dimension war eine Behinderung der folgenden Proteintrennung nach der Ladung in der 2. Dimension nicht auszuschließen. Die Eliminierung bzw. Minimierung der in den Fraktionen enthaltenen Ionen konnte durch die Entwicklung eines parallelisierten Verfahrens zur Dialyse von Mikroproben umgesetzt werden. Die in der Proteomanalytik erforderlichen hohen Probendurchsätze und die wachsende Bedeutung hochparallelisierter Screeningverfahren in der Industrie (Entwicklung spezieller Analyseverfahren mit passfähigen Hilfstechniken), führten zu einer Anordnung der Dialysepositionen entsprechend dem Mikroplattenraster von 8x12. Auf diese Weise kann eine große Anzahl Mikroproben parallel von störenden niedermolekularen Bestandteilen aufwandgering, effizient und gut handhabbar getrennt werden. Zu den allgemeinen Anforderungen der Probenvorbereitung vieler analytischer Verfahren zählen:

- niedrige Salz- und Detergentienkonzentrationen,
- ein hochparallelisiertes Handling der Proben im μl -Volumenbereich unter standardisierten Bedingungen zur Umsetzung der erforderlichen Analysefrequenz,
- eine hohe Wiederfindung,
- und eine gegebenenfalls schonende Konzentrierung der Proben, um die notwendige Empfindlichkeit zu erreichen.

Die Dialysekammer ist in ihrer Entwicklung so weit fortgeschritten, dass sie sich in einem prototypischen Zustand befindet. Sie wurde bei allen weiteren Serumentrennungen unter den angebenen Parametern eingesetzt (3.3.4 Dialyse gegen Puffer).

Eine denkbare Verbesserungsmöglichkeit des Verfahrens stellt die Integration der Probenplatte in ein Kreislaufsystem mit einem Zufluss, einem Abfluss und einer geeigneten Umwälzeinrichtung (Magnetrührer) dar. Unter den aufgeführten Umständen könnte der Prozess der Dialyse beschleunigt und das Volumen, gegen welches es zu dialysieren gilt, minimiert werden. Eine weitere Erhöhung der Effektivität ist durch die Bewegung der Probenplatte mit den darin befindlichen Flüssigkeiten zur gleichmäßigen Durchmischung der Proben möglich. Die genaue Anordnung der Dialysekammer in einem Kreislaufsystem ist der Abb. 33 zu entnehmen.

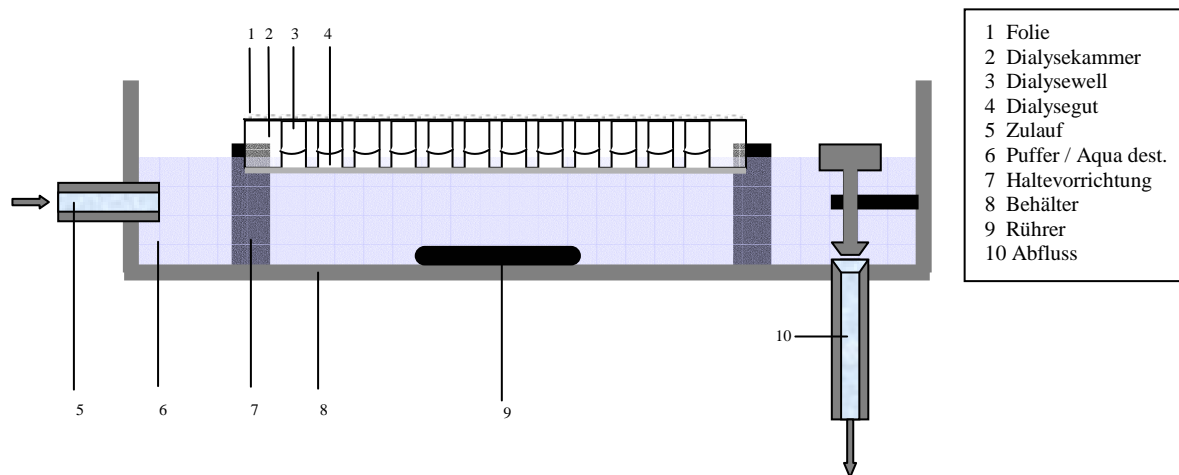


Abb.33: Anordnung der Dialysekammer im Kreislaufsystem (Seitenansicht)

5.4 Einschätzung der chromatographischen Trenntechnik

Das Ausmaß der Fortschritte auf dem Gebiet der Proteomforschung ist nicht nur anhand der großen Anzahl erschienener Publikationen in den letzten Monaten zu erkennen, sondern auch an der Schnelligkeit mit welcher die Entwicklungen stattfinden.

Es existieren gegenwärtig 2 Strategien in der Identifikation von Proteomen – „top down“ und „bottom up“. Die „top down“ Methode ist durch die Analyse intakter Proteine gekennzeichnet, während „bottom up“ die Untersuchung proteolytisch erzeugter Peptide bedeutet (Resing und Ahn 2005). Zu den „top down“ Techniken zählt die 2-D-Gel Elektrophorese wie auch die chromatographische Trenntechnik. Die multidimensionale LC/MS/MS Analyse und multidimensionale Protein-Identifikations-Technologie (MudPIT, Proteolyse komplexer Proteingemische mit anschließender chromatographischer Trennung und MS/MS Analyse) gehören zum „bottom up“ Vorgehen (Resing und Ahn 2005).

Immer wieder wird auf die begrenzenden Faktoren der in den letzten Jahren als Standardmethode eingesetzten 2-dimensionalen-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (Kapazität von ca. 3000 bis 10.000 Proteinen pro Gel) und den damit verbunden Schwierigkeiten (Sensitivität und Präzision) in der Untersuchung humaner Proteome verwiesen (Issaq et al. 2002). Hinzu kommt, dass beim zur Quantifizierung notwendigen Transfer der Proteine vom Trenngel auf Membranen Proteine verloren gehen können. Dies ist z.B. durch eine unvollständige Übertragung oder die Bindungseigenschaften der Membran bedingt (Westermeier und Marouga 2005). Außerdem enthält dieses Verfahren so viele Variable, dass eine Automatisierung unmöglich ist (Lopez 2000). Die genaue Auflistung der Nachteile dieser Trenntechnik ist im Kapitel 2.4 beschrieben.

Im Gegensatz zur Elektrophorese zeichnet sich 1-dimensionale chromatographische Trennungen komplexer Proteingemische durch eine geringe Trennschärfe aus. Dadurch besteht die Notwendigkeit der Entwicklung multidimensionaler Trenntechniken. Anderson sieht in der Kombination unabhängiger Trennmethode (z.B. Chromatographie mit einer 2-dimensionalen Gel-Elektrophorese oder der LC/MS-MS Analyse) die Möglichkeit der Erweiterung des dynamischen Bereiches um den Faktor 10-100 (Anderson und Anderson 2002). Auf der Suche nach effektiveren Fraktionierungs- und Trennmethode kommt auch für Haleem J. Issaq besonders die Kombination der verschiedenen Trennmechanismen wie z.B. der chromatographischen Verfahren (Größenausschluß-, Ionenaustausch- und Hydrophobizitätschromatographie), der Ultrazentrifugation und der Gel-Elektrophorese in Betracht (Issaq et al. 2002). Die Vorteile der Chromatographie sind für ihn nicht nur in der

multidimensionalen Anwendung, sondern auch in der möglichen Automatisierung, der Reproduzierbarkeit, der Schnelligkeit, dem Probendurchsatz sowie der entsprechenden Sensitivität zu sehen (Issaq 2002). Um eine Automatisierung zu erreichen, äußerte bereits 1998 John R. Yates den Gedanken, ein chromatographisches Verfahren bzw. eine Kapillarelektrophorese mit einer massenspektrometrischen Methode zu kombinieren (Yates 1998). Über eine geringe Flussgeschwindigkeit ($<100 \mu\text{l/min}$) und ein minimales Elutionsvolumen soll eine hohe Konzentration an Peptiden zur Massenbestimmung mittels ESI-MS erreicht werden und die Analysesensitivität erhöhen. Mit Hilfe einer polychromatographischen Trenntechnik innerhalb eines multidimensionalen Verfahrens wäre es zum einen möglich, die Zeitdauer für eine Proteomcharakterisierung zu verkürzen und zum anderen den Schritt einer Automatisierung zu realisieren. Automatisierung, Einfachheit und Robustheit bilden die Voraussetzungen für einen großen Anwendungsbereich des Verfahrens. Aufgrund der enormen Komplexität insbesondere des humanen Serums (siehe 5.1) aber auch anderer Proteome werden in der Literatur verschiedene Möglichkeiten diskutiert, um Proteine geringer Konzentrationen in komplexen Proteingemischen identifizieren zu können. In dieser Richtung sieht Pedersen et al. in der Vorfraktionierung von Proben ein wichtiges Werkzeug (Pedersen et al. 2005). Diese Vorfraktionierung kann durch fraktionierende Zentrifugation, Chromatographie und Elektrophorese erzielt werden (Righetti et al. 2005, Corthals et al. 2000). Auf diese Weise können der dynamische Bereich eingegrenzt und die Anzahl der Fraktionen begrenzt werden (Righetti et al. 2005). Auch T. Stasyk und L. Huber sehen in der Wahl der Trennmethode zur Proteinidentifikation einen entscheidenden Schritt (Stasyk und Huber 2004). Zusätzlich halten sie eine Kombination verschiedener Trenntechniken z.B. die 1-D SDS-Page-LC/MS/MS Analyse oder die 2-D LC-MS/MS Analyse für effektiv.

Innerhalb unserer Gruppe wurde die mehrdimensionale Chromatographie zur Trennung von komplexen Proteingemischen als Möglichkeit einer Weiterentwicklung der Proteomtechnologien favorisiert.

Die Anwendung der Größenausschlußchromatographie für die 1. Dimension ist durch eine einfache Handhabung und Durchführung gekennzeichnet. Die aufgebrachte Probe wird innerhalb von ca. 150 min nativ getrennt und durch einen automatischen Fraktionssammler in Proben der Volumina 1 ml fraktioniert. Diese können im Anschluss direkt quantifiziert, dialysiert und in der 2. Dimension getrennt werden. Diese Methode ist somit für die Analytik verschiedener Proteome leicht adaptierbar.

Die Größenausschlußchromatographie ist ein Verfahren, welches sich aufgrund physikalischer Gegebenheiten für große Proteinmengen besonders gut, für eine parallele Anordnung jedoch nicht eignet. Aus diesem Grund wurde das Verfahren in der 1. Dimension angewendet. Durch unsere Ergebnisse werden aber auch die geringe Trennschärfe einer 1-dimensionalen Trennung zur Charakterisierung eines komplexen Proteingemisches und dadurch die Notwendigkeit zusätzlicher Trennschritte deutlich.

Zu den potentiellen Vorteilen der mehrdimensionalen, nativen chromatographischen Trennung gehören:

- das Vorliegen aller Proteombestandteile in Lösung,
- Existenz etablierter Verfahren zur Quantifikation,
- Erhalt von Proteinkomplexen und posttranslationalen Modifikationen,
- potentiell gute Reproduzierbarkeit der Trennungen,
- schneller Zugriff auf die in Mikroplatten vorliegenden Fraktionen,
- gute Automatisierbarkeit,
- leichte Probenbehandlung für Massenspektrometrie,
- leichter Anschluss weiterer Fraktionierungsverfahren.

Der Zeitgewinn durch ein parallelisiertes Vorgehen ist von besonderer Bedeutung. Die Fraktionierung in der 1. Dimension beansprucht ca. 2,5 h. Eine Trennung der 96 im Mikroplattenformat vorliegenden Fraktionen über eine einzelne Säule käme durch den erheblichen Zeitaufwand nicht in Betracht. Durch die Umsetzung der 2. Dimension mit Hilfe des Polychromatographen können parallel die Fraktionen der 1. Dimension getrennt werden. Die Zeitdauer für die Trennung der 96 Fraktionen in 2400 Fraktionen der 2. Dimension beträgt dadurch ebenfalls nur ca. 3 h.

Da in der dargestellten Entwicklungsphase verschiedenste Proteinbestimmungsmethoden auf ihre Anwendbarkeit in der 2. Dimension getestet wurden, kann eine abschließende Aussage zur Reproduzierbarkeit der polychromatographischen Trenntechnik innerhalb dieser Arbeit nicht getroffen werden. Allerdings wurden die Experimente in der Arbeitsgruppe unter Verwendung der optischen Messung weitergeführt. Die Reproduzierbarkeit und Wiederfindungsraten erwiesen sich als gut (Kreusch et al. 2003). Durch die Weiterführung der Optimierungsversuche und die Kombination von PCG und optischer Messung konnte die Handhabung weiter verbessert werden.

5.5 Vergleich mit anderen publizierten Serum-Proteom-Untersuchungen

Im Verlauf der Untersuchungen, wurden mehrere Arbeiten zum Serum-Proteom veröffentlicht.

- Durch **N. L. Anderson und N. G. Anderson** konnten im **Oktober 2002 289 Proteine** im humanen Serum massenspektrometrisch identifiziert werden. Die Trennung des Proteoms erfolgte durch eine **2-dimensionale Gel-Elektrophorese**. Schätzungsweise korrespondieren die nachgewiesenen Proteine mit ca. 1000 - 1500 posttranslational modifizierten Proteinspots, jedoch wurden Proteine, welche in unterschiedlichen glykolysierten Formen vorliegen können, Spaltvarianten und Peptide von einer Größe < 5 kDa bei dieser Untersuchung nicht berücksichtigt (Anderson und Anderson 2002).
- **Joshua N. Adkins et. al** war es etwa zum gleichen Zeitpunkt (**November 2002**) möglich, **490 Proteine** zu identifizieren. Das besondere Augenmerk dieser Arbeit lag u.a. in der Probenvorbereitung. Zu Beginn wurden aus der zu charakterisierende Probe Proteine mit einer sehr hohen Serumkonzentration durch geeignete Verfahren entfernt, da diese die massenspektrometrische Analyse Proteine geringer Serumkonzentration stark behindern. Dies war im Fall der **Immunglobuline** und des **Albumins** durch den Einsatz der **Affinitätschromatographie** (Protein A/G) möglich. Dadurch wurden jedoch kleinere Proteine und Peptide, welche an Albumin gebunden sind potentiell mit entfernt, was sich in der Folge mehrfach bestätigte. Im Anschluss erfolgte nach einem **tryptischen Verdau** die Trennung des Peptidgemisches durch einen **Kationenaustauscher**. Die Auswertung der gewonnenen Daten nach durchgeführter **LC/MS-MS-Analyse** zeigte, dass auch Proteine geringer Konzentration ($c = \text{ng/ml}$) wie z.B. menschliche Wachstumshormone, Interleukin-12 und das Prostata-Antigen identifiziert werden konnten (Adkins et al. 2002).
- In der im **März 2003** erschienen Publikation der Forschungsgruppe **R. Pieper** und Mitarbeiter können **325 identifizierte Proteine** vorgewiesen werden. Für die Trennung des humanen Serums kam ein kombiniertes chromatographisch-elektrophoretisches Verfahren zum Einsatz. Ziel war es zunächst durch **Immunaaffinitätschromatographie** Proteine hoher Serumkonzentrationen (Albumin, Immunglobulin G, Haptoglobin, Transferrin, Transthyretin, α -1-Antitrypsin, α -1-Acid-Glycoprotein, α -2-Makroglobulin,

Hemopexin) zu eliminieren und den dynamischen Bereich der Proteinkonzentrationen der Serumproben einzugrenzen. Anschließend wurde eine 2-dimensionale zum Teil auch 3-dimensionale Chromatographie (**Größenausschlusschromatographie, Anionenaustauscher**) zur Trennung des Proteingemisches eingesetzt. Durch eine **2-dimensionale Gel-Elektrophorese** konnten 3700 Proteinspots ermittelt werden. Von diesen Spots wurden posttranslational modifizierte Proteine ausgeschlossen, 1800 Proteinspots dem **Massenspektrometer** zugeführt und schließlich 325 Proteine identifiziert (Pieper et al. 2003).

- Ebenfalls **2003** veröffentlicht wurden **341 identifizierte humane Serumproteine** von **R. S. Tirumalai** und seinen Mitarbeitern. In dieser Arbeit wurden die Proteine des humanen Serums in 2 Gruppen eingeteilt: Proteine mit einem hohen Molekulargewicht (high molecular weight = **HMW**) und Proteine mit einem geringen Molekulargewicht (low molecular weight = **LMW**). Der Gruppe der LMW-Proteine galt besonderer Beachtung, da zu ihnen u.a. die Moleküle mit großer physiologischer Bedeutung (Cytokine, Hormone, etc) und krankheitsassoziierte Proteine (z.B. Tumorerkrankung, Diabetes, kardiovaskuläre- und Infektionserkrankungen) gehören. Hingewiesen wird auch auf die Gefahr der Eliminierung des Albumins aus der Serumprobe. Albumin als Transport- und Carrier-Protein bindet eine Vielzahl an kleineren Proteinen, welche bei Entfernung des Albumins mit entfernt werden würden. Nach **Ultrazentrifugation** zur Aufhebung der Protein-Protein-Interaktionen (unter Verwendung 20% -igen Acetonitrils) war die Trennung des LMW-Proteoms vom HMW-Proteom durch den Einsatz einer **Filtrationsmembran** möglich. Das LMW-Proteom wurde anschließend einem **tryptischen Verdau** unterzogen, die Peptide durch einen **Kationenaustauscher** fraktioniert und eine **µLC-MS/MS** Analyse identifiziert. Die Eliminierung des Albumins konnte nachgewiesen werden, da keine Peptide des humanen Albumins in den Fraktionen identifiziert werden konnten (Tirumalai 2003).
- In unserer Gruppe erfolgte die Umsetzung der **2-dimensionalen chromatographischen Proteintrennung** (Größe, Ladung) des Serums eines weiblichen, gesunden Spenders. Die **Quantifizierung** wurde durch den Einsatz der in dieser Arbeit beschriebenen UV-Absorbanz-Messung umgesetzt. Durch die Entwicklung und Anwendung einer **Dialysekammer** konnte die Kompatibilität der verschiedenen Analyseverfahren (Trennschritte, Probenvorbereitung für das Massenspektrometer) gewährleistet werden.

Die **massenspektrometrische Identifikation** (tryptischer Verdau, ESI LC-MS-MS) der nach 2 Trennungen in den Fraktionen enthaltenen Proteine bzw. Peptide wurde durch die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe vorgenommen. Insgesamt wurden 422 LC-MS-MS Runs mit der Identifizierung von 130.528 Peptiden durchgeführt. Bis 2004 konnten nach Filterung der Daten mit entsprechenden Suchpeptiden **617 Proteine** zugeordnet werden. Verglichen mit den in den Publikationen von Adkins et al. und Pieper et al. angegebenen Ergebnissen von 490 und 325 identifizierte Serum-Proteine konnten 73 bzw. 85 übereinstimmende Proteine nachgewiesen werden. Übereinstimmend in allen 3 Arbeiten sind 42 Proteine. Nach weiterer **Optimierung** gelang **2006** die Identifizierung von **1860 Proteinen** (www.db-thueringen.de/servlets/DocumentServlet?id=4054).

6. Schlußfolgerungen

Die Proteinquantifizierung mittels Standardmethoden im Mikroplattenformat kann unter den aufgeführten Nachteilen grundsätzlich durchgeführt werden. Jedoch sind sie durch ihre geringe Sensitivität, den hohen Zeitbedarf (Inkubation, Verdünnungsreihen), den geringen linearen Bereich und dem Verlust der Probe nicht als „High-through-put“ Verfahren zur Proteinquantifikation in Proteom-Fraktionszahlen von 100 bis mehrere Tausend geeignet.

Ähnliche Nachteile weist die Silberfärbung auf. Auch hier ist der dynamische Bereich eingeschränkt sowie die Praktikabilität nur unzureichend. Lediglich die geringe benötigte Probenmenge ist als Vorteil zu bewerten.

Mit der Entwicklung der UV-Absorbanz-Messung eröffneten sich neue Perspektiven in der Quantifizierung des Modell-Proteoms. Die meisten Nachteile der Standardmethoden konnten durch dieses Verfahren überwunden werden. Um die Proteinquantifikation in der 1. sowie in der 2. Dimension zu ermöglichen ist lediglich eine geringe Probenmenge notwendig, welche aber unverändert weiteren analytischen Schritten zur Verfügung steht. Die parallele Messung der UV-Absorbanz mit einer Sensitivität im Bereich von 1-8000 µg Protein / ml wird zu diesem Zeitpunkt als praktikable Lösung gesehen.

Neben einer Optimierung der Quantifizierungsmöglichkeiten galt es ein paralleles Dialyseverfahren zur Probenvorbereitung zu entwickeln und für die Anwendbarkeit in der Proteomforschung zu überprüfen. Durch die Umsetzung in Form einer 12 x 8 well Dialysekammer können nun 96 Proben bzw. Fraktionen parallel, aufwandgering, effizient und gut handhabbar von störenden Substanzen befreit werden. Hierdurch kann die Kompatibilität der verschiedenen Trenn- und Analyseverfahren gewährleistet werden.

Die 2-dimensionale Trennung eines Proteingemisches durch chromatographische Verfahren konnte umgesetzt werden. Eine Möglichkeit zur Erlangung einer noch aufschlussreicheren Charakterisierung des Modell-Proteoms wäre in einer Erweiterung der Trenntechnik zu sehen. Bei der Annahme von 10.000 Proteinen im humanen Serum liegen nach einer 2-dimensionalen Trennung im Mittel 4 Proteine je well vor, Übertragen auf die Aussage von 500.000 Proteinen durch Adkins und Mitarbeiter (Adkins et al. 2002) 200 Proteine je well. Die Überlagerung der einzelnen Proteine durch die noch nicht voll ausgeschöpfte Möglichkeit der Trennung, macht eine Identifikation der Gesamtheit aller Proteine im Serum nur eingeschränkt möglich. Die Lösung dieses Problems könnte durch eine 3. Trenndimension

erfolgen. Daher muss eine weitere Auftrennung in der 3. Dimension z.B. nach hydrophoben oder anderen Eigenschaften der Proteine als Trennverfahren angedacht werden. Eventuell käme eine selektive 3. Trennung für die Fraktionen mit einem erhöhten Proteingehalt in Betracht.

Die auf diese Weise in der 1. und 2. Dimension gewonnen Daten (Trennung, Quantifizierung) konnten zu einem charakteristischem Proteinmuster zusammengefügt werden (siehe Abb.32). Die erzielte Anzahl von 1860 identifizierten Proteinen im humanen Serum nach einer 2-dimensionalen Trennung lässt weitere Identifikationen nach einer 3-dimensionalen Trennung als realistisch erscheinen.

Einen Ausblick lässt die Betrachtung des gewonnenen Proteinmusters eines gesunden, humanen Serums zu. Das Serum soll später als Zustandsbeschreibung und der Suche nach Markern pathologischer Zustände dienen. Das Vorliegen einer Krankheit muss zu Veränderungen des Proteinmusters führen, da sich sowohl die einzelnen Proteinkonzentrationen wie auch die Anwesenheit verschiedener Proteine (z.B. Bio-Marker) ändern können. Der Aufwand für die Erstellung von individuellen Diagnosen bzw. Proteinmustern erscheint jedoch auch mit dem verbesserten Verfahren noch sehr hoch (Quantifizierung und Identifikation aller enthaltenen Proteine). Hier sind weitere technische Verbesserungen der Proteomanalyse und Auswahlstrategien für potentielle markerhaltige Fraktionen erforderlich.

7. Literaturverzeichnis

- Adkins JN, Varnum SM, Auberry KJ, Moore RJ, Angell NH, Smith RD, Springer DL, Pounds JG (2002)
Toward a human blood serum proteome: analysis by multidimensional separation coupled with mass spectrometry.
Mol Cell Proteomics 1(12), 947-55
- Anderson NL, Anderson NG (2002)
The human plasma proteome: history, character, and diagnostic prospects.
Mol Cell Proteomics 1(11), 845-67
- Baenziger JU (1994)
Protein-specific glycosyltransferases: how and why they do it!
FASEB J 8 (13), 1019-25
- Bradford MM (1976)
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal Biochem 72, 248-54
- Corthals GL, Wasinger VC, Hochstrasser DF, Sanchez JC (2000)
The dynamic range of protein expression: a challenge for proteomic research.
Electrophoresis 21(6), 1104-15
- Dunn BM (1997)
Detection and Assay Methods.
Current Protocols in Protein Science, 3.0.1-3.0..2
- Goldring JP, Ravaioli L (1996)
Solubilization of protein-dye complexes on nitrocellulose to quantify proteins spectrophotometrically.
Anal Biochem 242(2), 197-201
- Horn A, Kreusch S, Bublitz R, Hoppe H, Cumme GA, Schulze M, Moore T, Ditz G, Rhode H (2006)
Multidimensional proteomics of human serum using parallel chromatography of native constituents and microplate technology.
Proteomics 6(2), 559-70
- Horn A, Publitz R, Kreusch S, Schwedler S, Sammler G (2001)
Probenplatte zur Verwendung in Dialysesystemen, Application for German Patent.
German Patent Office, Registriernummer 101 60 975.2
- Huber LA (2003)
Is proteomics heading in the wrong direction?
Nat Rev Mol Cell Biol 4(1), 74-80

- Humphery-Smith I, Cordwell SJ, Blackstock WP (1997)
Proteome research: complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds.
Electrophoresis 18(8), 1217-42
- Issaq HJ, Conrads TP, Janini GM, Veenstra TD (2002)
Methods for fractionation, separation and profiling of proteins and peptides.
Electrophoresis 23(17), 3048-61
- Jacobs JM, Adkins JN, Qian WJ, Liu T, Shen Y, Camp DG 2nd, Smith RD (2005)
Utilizing human blood plasma for proteomic biomarker discovery.
J Proteome Res 4(4), 1073-85
- Jungblut PR, Zimny-Arndt U, Zeindl-Eberhart E, Stulik J, Koupilova K, Pleissner KP, Otto A, Muller EC, Sokolowska-Kohler W, Grabher G, Stoffler G (1999)
Proteomics in human disease: cancer, heart and infectious diseases.
Electrophoresis 20(10), 2100-10
- Klose J (1975)
Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutations in mammals.
Humangenetik 26, 211-234
- Klose J, Kobalz U (1995)
Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome.
Electrophoresis 16(6), 1034-59
- Kreusch S, Hoppe H, Bublitz R., Rhode H, Moore T, Cumme GA, Ditz G, Horn A (2003)
Multidimensional proteome separation in preparative-scale using 96-fold parallel chromatography
- Kreusch S, Schwedler S, Tautkus B, Cumme GA, Horn A (2003)
UV measurements in microplates suitable for high-throughput protein determination.
Anal Biochem 313(2), 208-15
- Lopez MF (2000)
Better approaches to finding the needle in a haystack: optimizing proteome analysis through automation.
Electrophoresis 21(6), 1082-93
- Mann M (2002)
A home for proteomics data?
Nature 420, 21
- McDonald LJ et al (1994)
Enzymatic and nonenzymatic ADP-ribosylation of cysteine.
Mol Cell Biochem 138 (1-2), 221-6

- Mimnaugh EG et al (1999)
The measurement of ubiquitin and ubiquitinated proteins.
Electrophoresis 20 (2), 418-28
- O'Farrell PH (1975)
High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins
Biolog Chem 250, 4007-21
- Omenn GS (2004)
The Human Proteome Organization Plasma Proteome Project pilot phase: reference specimens, technology platform comparisons, and standardized data submissions and analyses.
Proteomics 4(5), 1235-40
- Omenn GS, Paik YK, Speicher D (2006)
The HUPO Plasma Proteome Project: a report from the Munich congress.
Proteomics 6(1),9-11
- Pandey M, Mann M (2000)
Proteomics to study genes and genomes.
Nature 405(6788), 837-46
- Pedersen SK, Sloane AJ, Prasad SS, Sebastian LT, Lindner RA, Hsu M, Robinson M, Bye PT, Weinberger RP, Harry JL (2005)
An immunoproteomic approach for identification of clinical biomarkers for monitoring disease: application to cystic fibrosis.
Mol Cell Proteomics 4(8), 1052-60
- Peterson GL (1983)
Determination of total protein.
Methods Enzymol 91, 95-119
- Pieper R, Gatlin CL, Makusky AJ, Russo PS, Schatz CR, Miller SS, Su Q, McGrath AM, Estock MA, Parmar PP, Zhao M, Huang ST, Zhou J, Wang F, Esquer-Blasco R, Anderson NL, Taylor J, Steiner S (2003)
The human serum proteome: display of nearly 3700 chromatographically separated protein spots on two-dimensional electrophoresis gels and identification of 325 distinct proteins.
Proteomics 3(7), 1345-64
- Putnam FW(1975-1987)
The plasma proteins structure, funktion and genetic controll.
Academic Press New York
- Resing KA and Ahn NG (2005)
Proteomics strategies for protein identification.
FEBS Lett 579(4), 885-9
- Righetti PG, Castagna A, Antonioli P, Boschetti E (2005)
Prefractionation techniques in proteome analysis: the mining tools of the third millennium.
Electrophoresis 26(2), 297-319

Sapan CV, Lundblad RL, Price NC (1999)
Colorimetric protein assay techniques.
Biotechnol Appl Biochem 29 (Pt 2), 99-108

Sedmak JJ, Grossberg SE (1977)
A rapid, sensitive, and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250.
Anal Biochem 79(1-2), 544-52

Shen Y, Kim J, Strittmatter EF, Jacobs JM, Camp DG 2nd, Fang R, Tolie N, Moore RJ, Smith RD (2005)
Characterization of the human blood plasma proteome.
Proteomics 5(15), 4034-45

Stasyk T, Huber LA (2004)
Zooming in: fractionation strategies in proteomics.
Proteomics 4(12), 3704-16

Staudenmann W, Hatt PD, Hoving S, Lehmann A, Kertesz M, James P. (1998)
Sample handling for proteome analysis.
Electrophoresis 19(6), 901-8

Stoscheck CM (1990)
Quantitation of protein.
Methods Enzymol 182, 50-68

Tirumalai RS, Chan KC, Prieto DA, Issaq HJ, Conrads TP, Veenstra TD (2003)
Characterization of the low molecular weight human serum proteome.
Mol Cell Proteomics 2(10), 1096-103

Traini M, Gooley AA, Ou K, Wilkins MR, Tonella L, Sanchez JC, Hochstrasser DF, Williams KL (1998)
Towards an automated approach for protein identification in proteome projects.
Electrophoresis 19(11), 1941-9

Walsh BJ, Molloy MP, Williams KL (1998)
The Australian Proteome Analysis Facility (APAF): assembling large scale proteomics through integration and automation.
Electrophoresis 19(11), 1883-90

Westermeier R., Marouga R (2005)
Protein detection methods in proteomics research.
Biosci Rep 25(1-2),19-32

Yates JR 3rd (1998)
Mass spectrometry and the age of the proteome.
J Mass Spectrom 33(1), 1-19

www.db-thueringen.de/servlets/DocumentServlet?id=4054
www.hupo.org
www.piercenet.com

Danksagung

Herrn Professor Dr. A. Horn danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit.

Besonderen Dank schulde ich Frau PD Dr. H. Rhode für die Durchsicht meiner Arbeit und vielen Hinweise, die zur Vollendung derselben notwendig waren.

Herrn Dr. S. Kreusch danke ich für die Geduld und Hilfsbereitschaft, die er mir entgegenbrachte.

Lebenslauf

Vor- und Zuname	Sina Schwedler	
Geburtsdatum/-ort	31.08.1978 / Weimar (Thüringen)	
Staatsangehörigkeit	Deutsch	
Familienstand	ledig	
Wohnort	99096 Erfurt Eichendorffstr. 14	
Schulausbildung	09/1985 – 07/1991	4. POS Eisenach
	08/1991 – 07/1997	Ernst Abbe Gymnasium Eisenach Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Studium	10/1997-01/2003	Studium der Zahnmedizin an der Friedrich Schiller Universität Jena Abschluss: Staatsexamen
	02/2003	Approbation als Zahnärztin
Berufliche Tätigkeit	03/2003 – 03/2005	Assistenz Zahnärztin Praxis Dr. Peter Schwedler Langensalzaerstrasse 31, 99817 Eisenach
	seit 04/2005	Entlastungsassistentin Praxis Dr. Peter Schwedler Langensalzaerstrasse 31, 99817 Eisenach

Ort, Datum

Unterschrift

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. A. Horn, PD Dr. H. Rhode und Dr. S. Kreusch,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers